

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени В.И. ВЕРНАДСКОГО»
ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ, ЭКОЛОГИИ И ФАРМАЦИИ

НАУЧНАЯ РАБОТА

на соискание премии Государственного Совета Республики Крым
студентам образовательных организаций «За научные достижения в
сфере приоритетных направлений развития Республики Крым»

в номинации «Естественные науки»
НА ТЕМУ:

«ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ПРОБИОТИЧЕСКОГО МИКРОБНОГО КОНСОРЦИУМА НА ФОНЕ АЛЛОКСАН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА»

Авторы работы: Аединова Диана Закировна,
Назырова Лина Эльдаровна,
обучающиеся 1 курса 06.04.01 Биология,
кафедра физиологии человека и животных и
биофизики

Научный руководитель: Джелдубаева Эльвиза Рашидовна,
кандидат биологических наук доцент
кафедры физиологии человека и животных и
биофизики
Ярмолук Наталья Сергеевна, кандидат
биологических наук доцент кафедры
физиологии человека и животных и
биофизики

**Место выполнения
работы:** Центр коллективного пользования научным
оборудованием «Экспериментальная
физиология и биофизика» при кафедре
физиологии человека и животных и
биофизики Институт биохимических
технологий, экологии и фармации

Симферополь, 2025

РЕФЕРАТ

Известно, что сахарный диабет оказывает отрицательное влияние на когнитивную активность, а также вызывает изменения биохимических и гистологических показателей организма.

Целью данного исследования было изучение влияния пробиотического микробного консорциума на уровень тревожности, биохимические параметры крови и морфологическое состояние внутренних органов крыс в экспериментальной модели аллоксан-индуцированного диабета.

Эксперимент выполнен на 30 половозрелых крысах-самцах линии *Wistar* со средней двигательной активностью, которая была определена в тесте открытое поле. Животные были разделены на 3 группы по 10 особей в каждой. Крысам второй и третьей группы был моделирован аллоксан-индуцированный диабет. На десятые сутки после моделирования диабета, крысам третьей группы интрагастрально ввели 1 % раствор пробиотического микробного консорциума (3 мл), животным других групп вводили эквивалентный объем питьевой воды. Регистрация уровня тревожности проводилась на 1-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки после введения пробиотического микробного консорциума с в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт». Биохимический анализ крови проводили на 22-е сутки после декапитации животных помощью автоматического анализатора Mindray BS-800; морфометрический анализ печени, почек и кишечника – с использованием гистопрепаратов и программы Aperio ImageScore. Статистическая обработка данных проводилась с помощью критериев Шапиро-Уилка, Краскела-Уоллиса.

Показано комплексное положительное влияние ПМК на уровень тревожности, биохимические и гистологические показатели внутренних органов у крыс с аллоксановым диабетом, включая противовоспалительный, гепатопротекторный и нефропротекторный эффекты. Результаты могут быть

использованы при разработке новых вспомогательных средств для коррекции осложнений сахарного диабета.

Работа обладает высокой научной значимостью, поскольку расширяет представления о взаимосвязи между микробиотой кишечника и осложнениями диабета. При дальнейшем развитии исследований можно ожидать создание на основе ПМК безопасных и эффективных нутрицевтиков, способных замедлять развитие осложнений диабета.

Ключевые слова: пробиотический микробный консорциум, аллоксан-индуцированный диабет, уровень тревожности, биохимические показатели крови, морфометрия, почки, печень, кишечник.

Научная работа состоит из введения, 3 разделов, выводов, списка литературы из 91 источника. Работа изложена на 70 страницах печатного текста, содержит 6 таблиц, 17 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ	10
1.1. Биологическая эффективность применения пробиотиков при сахарном диабете.....	10
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	16
2.1. Организация экспериментальной части исследования	16
2.2. Методика формирования однородных групп животных	18
2.3. Методика введения аллоксана	19
2.4. Состав пробиотического микробного консорциума и методика введения	21
2.5. Методы исследования двигательной активности	22
2.6. Методика проведения биохимического скрининга у крыс.....	24
2.7. Методика морфометрического анализа внутренних органов крыс	25
2.7.1. Методика морфометрического анализа печени	26
2.7.2. Методика морфометрического анализа почек	27
2.7.3. Методика морфометрического анализа кишечника	30
2.8. Статистическая обработка данных.....	31
2.9. Соблюдение этических стандартов	32
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1. Изучение тревожности крыс с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»	33

3.2. Изменение биохимического анализа крови крыс с аллоксан-индуцированным диабетом под влиянием пробиотического микробного консорциума	35
3.3. Морфометрические показатели печени крыс с аллоксан-индуцированным диабетом при введении пробиотического микробного консорциума	40
3.4. Морфометрические показатели почек крыс с аллоксан-индуцированным диабетом при введении пробиотического микробного консорциума	44
3.5. Морфометрические показатели кишечника крыс с аллоксан-индуцированным диабетом при введении пробиотического микробного консорциума	52
ВЫВОДЫ	57
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	59

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Ал	–	Аллоксан
АЛТ	–	Аланинаминотрансфераза
АСТ	–	Аспартатаминотрансфераза
ДН	–	Диабетическая нефропатия
ИР	–	Инсулиновая резистентность
К	–	Контроль
КОЕ	–	Колониеобразующая единица
КЦЖК	–	Короткоцепочечные жирные кислоты
ЛДГ	–	Лактатдегидрогеназа
ЛПВП	–	Липопротеины высокой плотности
ЛПНП	–	Липопротеины низкой плотности
ЛПС	–	Липополисахариды
ОП	–	Тест «открытое поле» (open field)
ПМБ	–	Пробиотический микробный консорциум
ПР	–	Пробиотики
СД	–	Сахарный диабет
СД1	–	Сахарный диабет 1-го типа
СД2	–	Сахарный диабет 2-го типа
СРБ	–	С-реактивный белок
ЩФ	–	Щелочная фосфатаза
FPG	–	Уровень глюкозы в плазме
HbA1c	–	Гликированный гемоглобин

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) – наиболее распространенное заболевание нашего времени, которое негативно влияет на здоровье людей. В последнее десятилетие наблюдается увеличение числа случаев заболевания сахарным диабетом по всему миру, что обуславливает важность изучения не только физиологических, но и поведенческих аспектов. Данное заболевание сопровождается гипергликемией, нарушением обмена веществ, воспалительными процессами, повышением уровня тревожности и поражением органов-мишеней: печень, почки, желудочно-кишечный тракт, сердечно-сосудистая и нервная системы [10, 19, 59].

На фоне изучения механизмов системных поражений органов при СД особое внимание уделяется новым подходам к их профилактике и коррекции, которые могут стать эффективным дополнением к традиционной терапии. Современные исследования показывают, что состояние микробиоты кишечника играет важную роль в регуляции углеводного обмена и системного воспаления [11, 12]. Одним из перспективных направлений является использование пробиотиков (ПБ) – микроорганизмов, которые способны, модифицировать микрофлору, оказывать благоприятное воздействие на метаболические процессы, снижать уровень воспалительных цитокинов, корректировать инсулинорезистентность и уменьшать окислительный стресс [28]. Пробиотические микробные консорциумы (ПМК), состоящие из нескольких штаммов бактерий, демонстрируют более выраженный эффект по сравнению с монокомпонентными пробиотиками, что делает их особенно интересным объектом исследования. Ось «кишечник–микробиота–метаболизм» в настоящее время рассматривается как ключевой патогенетический механизм, влияющий на течение и осложнения СД [49, 64]. В ряде исследований показано гепатопротекторное, нефропротекторное и противовоспалительное действия ПБ [47, 69, 81], что подчеркивают

перспективность разработки новых пробиотических комплексов, способных влиять на ключевые звенья патогенеза диабета. В связи с этим исследование воздействия ПМК на биохимические, морфологические и морфометрические параметры при аллоксан-индуцированном диабете является крайне актуальным.

Также прорывом в области нейрофизиологии является переосмысление значимости кишечной микробиоты в регуляции мозговой деятельности и поведении. Применение психобиотиков, живых микроорганизмов, обладающих потенциально благоприятным влиянием на психическое здоровье, для воздействия на систему «микробиом-кишечник-мозг». Исследования микробиоты кишечника как посредника в этом взаимодействии предоставили растущее количество научных доказательств того, что микробиота кишечника влияет на стресс и эмоциональные реакции, а также на расстройства, связанные со стрессом [84].

Аллоксановый диабет является моделью, широко используемой в экспериментальной биологии и медицине для изучения патогенеза заболевания и разработки новых методов лечения [56]. Показано, что аллоксан вызывает разрушение β -клеток поджелудочной железы, что приводит к развитию гипергликемии, аналогичной СД 1. Это сопровождается изменением биохимических показателей крови, включая повышение уровня глюкозы, нарушения липидного профиля и активности антиоксидантных систем. Применение ПМК в таких условиях позволяет изучить их влияние на ключевые параметры метаболизма.

Таким образом, изучение влияния ПМК на поведенческие аспекты, биохимические показатели крови и морфологическое состояние внутренних органов (печень, почки, кишечник) позволит расширить понимание потенциала ПМК как вспомогательного средства в лечении данного заболевания.

В связи с вышеизложенным, **целью** данной работы явилось выявление изменения уровня тревожности, биохимических показателей крови и гистологических показателей внутренних органов крыс, после введения курса пробиотического микробного консорциума, в модели аллоксан-индуцированного диабета.

Задачи исследования:

1. Выявить изменения уровня тревожности крыс после введения пробиотического микробного консорциума в модели аллоксан-индуцированного диабета.

2. Выявить изменения биохимических показателей крови крыс после введения пробиотического микробного консорциума в модели аллоксан-индуцированного диабета.

3. Выявить изменения морфометрических показателей печени крыс после введения пробиотического микробного консорциума в модели аллоксан-индуцированного диабета.

4. Выявить изменения морфометрических почек крыс после введения пробиотического микробного консорциума в модели аллоксан-индуцированного диабета.

5. Выявить изменения морфометрических показателей кишечника крыс после введения пробиотического микробного консорциума в модели аллоксан-индуцированного диабета.

Объект исследования – изменение уровня тревожности, биохимических и гистологических показателей внутренних органов у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом и под влиянием пробиотического микробного консорциума.

Предмет исследования – поведенческие реакции, кровь, внутренние органы крыс с аллоксан-индуцированным диабетом.

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

1.1. Биологическая эффективность применения пробиотиков при сахарном диабете

Сахарный диабет (СД) — это заболевание с нарушением обмена веществ, характеризующееся хронической гипергликемией из-за резистентности к инсулину и/или дисфункции β -клеток поджелудочной железы, распространённость которого в последние десятилетия возрастает. Хронический диабет может привести к серьёзным проблемам, таким как нарушение функции почек, инсульт, ампутацию конечностей, слепота и инфаркт миокарда. Несмотря на разнообразие доступных в настоящее время методов лечения, число случаев диабета и его осложнений растёт. Показано, что такие факторы, как уровень глюкозы в крови, резистентность к инсулину, окислительный стресс и нейровоспаление, играют важную роль в развитии диабетических когнитивных нарушений [11, 32, 40].

На сегодняшний день была выявлена взаимосвязь между кишечником и мозгом, и всё больше исследований показывают, что микробиота кишечника играет важную роль в развитии синдрома раздражённого кишечника [76]. У пациентов с СД, особенно 2 типа (СД2), часто наблюдается дисбактериоз, характеризующийся снижением разнообразия микробиоты, увеличением количества патогенных микроорганизмов, нарушением проницаемости кишечного барьера (“синдром дырявого кишечника”), что способствует системному воспалению. Эти изменения связаны с развитием инсулинорезистентности, гипергликемии и осложнений диабета [68]. Точный механизм этого нарушения неизвестен, однако многие факторы, такие как ожирение, малоподвижный образ жизни, генетическая предрасположенность и другие факторы окружающей среды, а теперь и микробиом, по-видимому, влияют на возникновение и развитие этого заболевания.

Воспаление — хорошо известный предшественник метаболического синдрома, который повышает риск гипертонии, висцерального ожирения и дислипидемии, что может привести к СД2 из-за повреждения β -клеток поджелудочной железы и снижения секреции инсулина. Современные представления о пользе пробиотиков при СД2 основаны на данных, полученных как на животных, так и в клинических условиях, и в основном касаются их влияния на ИР, антропометрические показатели, гликемический контроль и маркеры хронического системного воспаления. С другой стороны, отсутствуют научно обоснованные данные об эффективности пробиотиков в отношении функции β -клеток поджелудочной железы при диабете 2-го типа и связанных с ним метаболических нарушениях [65].

Исследователи сосредоточились на поиске методов лечения с низкой токсичностью и небольшим количеством побочных эффектов, которые могли бы эффективно контролировать СД. Различные исследования роли микробиоты кишечника в развитии СД2 и связанных с ним осложнений привели к росту интереса к пробиотическим добавкам. Эти организмы обладают несколькими уникальными свойствами, в том числе низкой стоимостью, высокой надёжностью и хорошим профилем безопасности.

Пробиотики (ПБ), которые являются перспективной стратегией лечения СД2, показали свою эффективность как в экспериментах на животных, так и в клинических испытаниях на людях. ПБ могут способствовать поддержанию гомеостаза глюкозы, улучшать липидный обмен, стимулировать выработку короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) и уменьшать воспалительные реакции в экспериментальных моделях на животных. Однако клиническое применение ПБ по-прежнему затруднено из-за существенных различий между экспериментальными моделями на животных и людьми, и применение гуманизированных моделей на животных, не относящихся к грызунам, может способствовать клиническому применению пробиотиков в будущем [71].

Показано, что прием ПБ может способствовать регуляции уровня глюкозы в крови за счет модуляции кишечной флоры, уменьшения хронического воспаления низкой степени тяжести, модуляции глюкагоноподобного пептида-1, снижения окислительного стресса, улучшения резистентности к инсулину и увеличения содержания КЦЖК.

В работе [51] представлен систематический обзор и метаанализ рандомизированных контролируемых исследований, в которых изучалась эффективность ПБ и синбиотиков для контроля гликемии у пациентов с сахарным диабетом 1-го (СД1) и 2-го (СД2) типа. Первичными результатами были изменения уровня гликированного гемоглобина (*HbA1c*), уровня глюкозы в плазме натощак и уровня инсулина. Результаты исследования показывают, что ПБ и синбиотики могут быть эффективны в качестве дополнительных методов лечения диабета. Кроме того, исследование подчеркивает необходимость дальнейших специализированных исследований, учитывающих такие переменные, как типы штаммов и географические факторы, для более глубокого понимания роли этих методов лечения в борьбе с диабетом.

Вместе с тем, в работе [85] представлен обзор исследований на животных по оцениванию влияние ПБ *Bifidobacterium* на показатели гликемии. В целом, в моделях на животных были получены убедительные доказательства эффективности *Bifidobacterium* в снижении повышенного уровня фибриногена, но не в клинических испытаниях. Это позволяет предположить, что сами по себе ПБ могут оказывать минимальное влияние на гликемический контроль, могут быть более эффективными в сочетании с другими видами пробиотиков или могут быть более эффективными в условиях гипергликемии, а не при повышенном уровне глюкозы.

Показано, что дисбиоз или дисбаланс микроорганизмов в кишечнике связан с предрасположенностью к СД1 и его прогрессированием. Отмечено, что уровень глюкозы в плазме натощак снизился после приема ПБ, однако

значительного улучшения показателей *HbA1c* в сыворотке крови, С-пептида и потребности в инсулине не наблюдалось. Прием ПР может быть дополнительной терапевтической стратегией при СД1 [70].

Кроме того, выявлена сложная роль дисбиоза микробиоты кишечника в возникновении и развитии СД2 и связанных с ним микрососудистых осложнений. Эти осложнения включают диабетическую нефропатию (ДН) и диабетическую ретинопатию, диабетическую невропатию, нарушения мозгового кровообращения и ишемическую болезнь сердца [74]. Показано, что лечение ПБ может снизить уровень *HbA1c*, фибриногена и резистентность к инсулину у пациентов с СД2 [80]

Однако применение ПБ при СД2 имеет сложные механизмы, направленные на восстановление кишечного тракта, функции поджелудочной железы, метаболизма организма и самовосстановления поскольку патогенез СД2 сложен [66].

Возможные механизмы действия ПБ включают модуляцию микробиоты кишечника, выработку КЦЖК и глюкагоноподобных пептидов, ингибирование α -глюкозидазы, повышение уровня SIRT1, снижение уровня фетопротейна-А и регулирование уровня воспалительных цитокинов [50].

В целом, ПБ способствуют улучшению гомеостаза глюкозы за счёт стимуляции продукции инкретинов, в частности глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), который усиливает секрецию инсулина и снижает глюконеогенез [13]. Вызывают улучшения инсулинорезистентности, увеличивая продукцию КЦЖК, таких как бутират, улучшает чувствительность тканей к инсулину [12]. Некоторые штаммы ПБ ингибируют активность ферментов, расщепляющих углеводы, вызывая снижение постпрандиальной гипергликемии [9]. ПБ уменьшают уровень противовоспалительных цитокинов (*IL-6*, *TNF- α*) и повышают уровень противовоспалительных молекул (*IL-10*). Уменьшение воспаления способствует восстановлению функций инсулиновых рецепторов и снижению системного воспаления [25].

Также ПБ снижают уровень триглицеридов, общего холестерина и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), улучшая липидный профиль. Это уменьшает риск сердечно-сосудистых осложнений при диабете [83].

ПБ укрепляют кишечный барьер, уменьшая проницаемость эпителия для эндотоксинов (например, липополисахаридов). Снижение его уровня в крови уменьшает системное воспаление и улучшает метаболизм глюкозы [28]. Также увеличивают уровень антиоксидантных ферментов (например, супероксиддисмутазы) и снижают уровень окислительного стресса, который играет важную роль в патогенезе диабета [18].

В работе [77] изучено профилактическое действие и механизмы, лежащие в основе действия *Lactobacillus fermentum*, *L. fermentum*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus gasseri* на мышей с СД2, вызванным стрептозотоцином и высокожировой диетой. Результаты показали, что большинство из четырех ПБ значительно снижали потерю веса и повреждение печени и поджелудочной железы улучшали метаболизм глюкозы, регулируя уровень глюкагоноподобного пептида-1 (*GLP-1*), уровень глюкозы и инсулина натощак, а также повышая экспрессию переносчиков глюкозы. ПБ улучшали гиперлипидемию, воспаление и окислительный стресс, снижая секрецию липидов в крови и противовоспалительных цитокинов, повышая уровень антиоксидантных ферментов. ПБ восстанавливали микробиоту кишечника, повышая (снижая) относительное количество полезных (вредных) бактерий и изменяя определённые метаболические пути у мышей с СД2.

Следовательно, результаты варьируются в зависимости от штаммов ПБ, дозировки и продолжительности терапии. Ограничения применения связаны с недостаточностью долгосрочных клинических исследований, отсутствием стандартизированных протоколов по применению ПБ при СД, индивидуальными различиями в ответе на пробиотическую терапию. Перспективы применения их связаны с использованием комбинаций пробиотиков и пребиотиков (синбиотиков), разработкой

персонализированных пробиотических продуктов на основе анализа микробиома пациента, а также дальнейшем изучение механистических аспектов действия ПБ.

Таким образом, ПБ обладают значительным потенциалом в управлении СД благодаря их способности модулировать микробиоту кишечника, уменьшать воспаление, улучшать метаболизм глюкозы и липидов. Несмотря на обнадеживающие результаты, необходимы дальнейшие исследования для стандартизации подходов к их применению в терапии диабета и понимания их влияния на организм.

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Организация экспериментальной части исследования

Работа выполнялась в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» при кафедре физиологии человека и животных и биофизики.

Эксперименты проводились на белых половозрелых крысах-самцах линии *Wistar*, которые были специально выведены для лабораторных исследований. Общая выборка составила 30 здоровых крыс, массой 300-350 грамм, разделенных на 3 экспериментальные группы по 10 животных:

1. Группа «Контроль» (К) – 10 особей, содержались в стандартных условиях вивария, вводили эквивалентный объем питьевой воды;

2. Группа «Аллоксан» (Ал) – 10 особей, был смоделирован сахарный диабет (СД) путем внутрибрюшинного введения аллоксана в дозировке 100 мг/кг в течение трех дней, вводили эквивалентный объем питьевой воды;

3. Группа «Аллоксан+Пробиотик» (Ал+Пб) – 10 особей, был смоделирован СД, на 10-й день интрагастрально вводили 1% раствор исследуемого ПМК по 3 мл в течение 21 суток.

Тревожность исследовали на 1-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки после введения ПМК в тесте "Приподнятый крестобразный лабиринт".

На 22 сутки животных выводим из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом с соблюдением правил эвтаназии.

Кровь забирали для биохимического анализа, который провели автоматическим методом при использовании набора химических реактивов производства Mindray на анализаторе Mindray BS-800.

Подготовка гистологического материала осуществлена в ЦКП «Молекулярная биология» Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского. Гистологические препараты готовили в соответствии со стандартными методиками. Фиксировали

фрагменты внутренних органов (кишечника, печени, почек) в 10%-м забуференном формалине (pH 7,2) в течение 24 часов. После этого осуществляли дегидратацию и пропитку парафином в микроволновом гистологическом процессоре LOGOS (Mielstone, Италия) с использованием программы, рекомендованной производителем. Пропитанные парафином кусочки органов заливали в блоки, из которых изготавливали полутонкие срезы толщиной 4 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином [25].

Гистологические препараты просматривали под микроскопом DM2000 с объективами Plan5x, 10x и 40x и фотографировали камерой DFC295 (Leica). Морфометрические измерения выполняли на микрофотографиях с помощью специализированного программного обеспечения Aperio Imagescope (версия 12.4.6.5003) для анализа цифровых гистологических изображений (WSI, Whole Slide Images), полученными с помощью сканеров Aperio. Данная программа позволяет детально изучать гистологические препараты, увеличивать интересующие области срезов, измерять размеры клеток, ядер, межклеточного пространства и других структур тканей. С помощью встроенных алгоритмов количественный анализ показателей (подсчет количества, определение плотности клеток; анализ ядерно-цитоплазматических соотношений и пр.).

Согласно государственному стандарту РФ «ГОСТ 33216-2014, Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными, Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами, Правила оборудования помещений и организации процедур» – испытуемые животные содержались в адекватных условиях, в соответствии с тезисами вышеприведённого государственного норматива.

Крысы были под наблюдением и контролем в стандартно оснащённом виварии, с близким к естественному и адекватному природным циркадным ритмам животных, 12-ти часовым свето-темновым циклом, к которому были задействованы дополнительные источники-светильники с рассеянным светом, интенсивность отдачи которого равнялась 325 лк.

Клетки располагались на уровне 1 м от пола. Средняя температура в виварии составляла 18 – 22°C, что обеспечивало комфортные условия для животных. Относительная влажность помещения не превышала 55% от установленной нормы по требованиям «ГОСТ 33216-2014». Частота воздухообмена составляла 1,5 часовых объёма.

Содержались крысы непосредственно в групповых клетках, имеющих прямой контакт с гранулированным капсульным древесным подстилом, синтезированным из экологически чистых лиственных пород, что исключало расстройства реализации животными природных адекватных поведенческих нужд.

Также в клетках присутствовал свободный доступ к воде и гранулированному комбикорму со сбалансированным содержанием белкового, жирового и углеводного баланса компонентов. Поение и кормление проводилось подконтрольно, согласно внутреннему распорядку работы вивария.

Все действия с крысами в ходе эксперимента были проведены с учетом требований разработки и реализации этапов доклинических исследований, а также с соблюдением всех этических стандартов, что гарантировало минимизацию стресса и дискомфорта для подопытных особей.

2.2. Методика формирования однородных групп животных

Методика, используемая для формирования однородных групп – тест «открытое поле» (open field) (ОП) для оценки локомоторной активности. В тесте используется рабочая станция 45 x 45 см с прозрачными стенками высотой 20 см, представляющую актиметр (IR Actimeter, Pan Lab Harvard Apparatus, Испания) с двумя инфракрасными рамками. На данную площадку помещается крыса и фиксируются разные виды локомоторной активности в виде вертикальной и горизонтальной двигательной активности, траектории передвижения, средней скорости, (рисунок 2.1). В течение отведенного

времени фиксируется количество актов дефекации и уринации, что является определяющим признаком эмоциональности, или же показателем нейротизма животного. Благодаря данному тесту из популяции можно выделить критически отличающихся особей, оценить реакцию животного на новую обстановку и поведение в стрессовой ситуации для стереотипизации выборки животных для эксперимента.

Эксперименты проводили через 2-3 недели после формирования однородных групп животных.

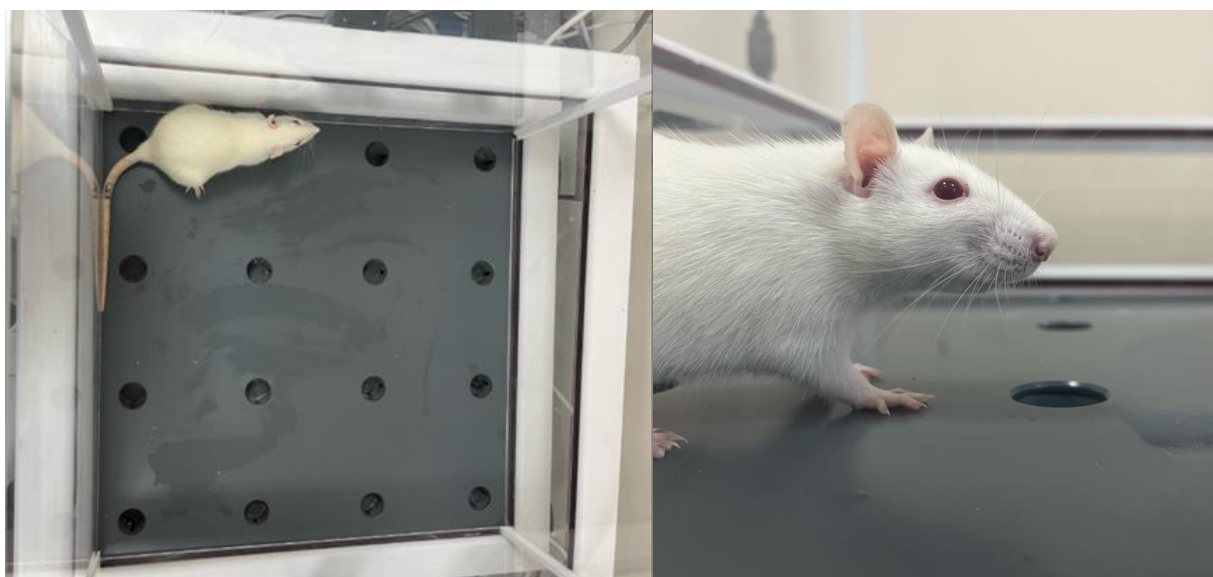


Рисунок 2.1 – Измерения двигательной активности в тесте «инфракрасный актиметр»

2.3. Методика введения аллоксана

Аллоксан моногидрат (мезоксалиломочевина, $C_4O_4H_2N_2 \times H_2O$, компания «Диаэм», Россия) – продукт распада мочевой кислоты, образуется при действии окислителей в присутствии свободных сильных кислот. Молекулярный вес – 160 г/моль, желтоватый или бесцветный порошок, содержание воды – 11-12%.

Для проведения экспериментальных работ с хроническими воздействиями необходимо моделирование субкомпенсированного состояния

при СД1 и увеличение выживаемости животных при моделировании декомпенсированного состояния. Введение данного вещества проводилось трехкратно и поочередно в количестве 10 мг/100 г, 10 мг/100 г, 10 мг/100 г веса животных с интервалом через 24 часа. Показано, что через 30 суток после первого введения аллоксана развивается аллоксановый СД в декомпенсированной форме [8].

Дозировка была рассчитана в соотношении 1:10 массы аллоксана к физиологическому раствору.

При планировании эксперимента также учитывали, что диабетогенное действие аллоксана более активно проявляется у животных, находящихся на предварительной диете, поэтому все животные в течение 24 часов до начала эксперимента не получали пищу, но имели доступ к воде [29].

Для определения возникновения СД в ходе эксперимента проводились измерения уровня сахара в крови, взятой из разреза на хвосте крыс, с помощью глюкометра «iCheck», а также определяли содержание глюкозы в моче с использованием диагностических тест-полосок «Уриполиан – XN 11A №100» (рисунок 2.2).

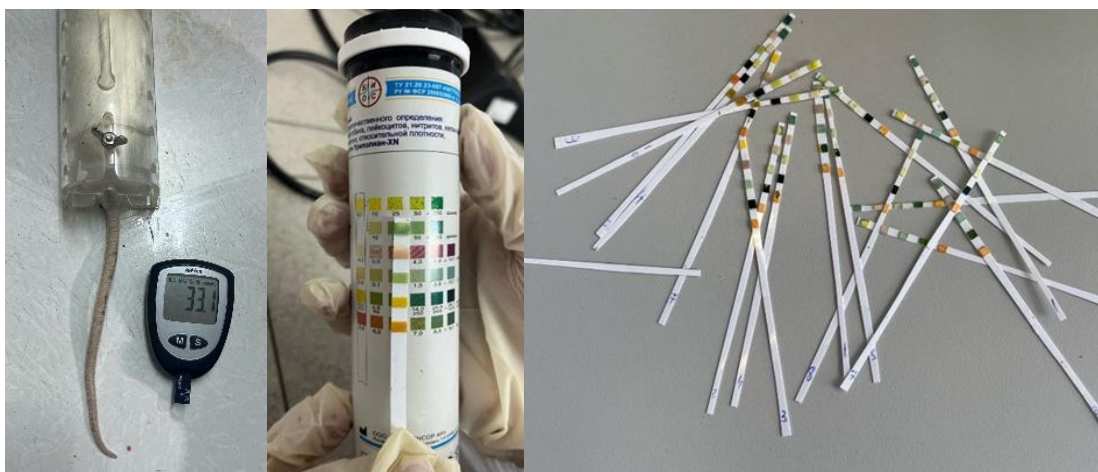


Рисунок 2.2 – Измерения уровня сахара в крови крыс с помощью глюкометра «iCheck», а также с использованием диагностических тест-полосок «Уриполиан – XN 11A №100»

2.4. Состав пробиотического микробного консорциума и методика введения

Животным третьей группы интрагастрально вводился ПМК с использованием желудочного орального зонда для кормления мышей и крыс в объеме 3 мл 1 % раствора пробиотика (рисунок 2.3).



Рисунок 2.3 – Пероральное введение пробиотика крысам

Синтез тестируемого ПМК проводился на кафедре ботаники и физиологии растений и биотехнологий ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» под руководством Ржевской В. С.

ПМК включал штаммы пробиотических микроорганизмов: *Lactobacillus parabuchneri* ВКМ В-3553D, *Lactobacillus plantarum* ВКМ В-3552D, *Lactobacillus acidophilus* ВКМ В-3563D, *Enterococcus faecium* ВКМ В-3551D, *Brettanomyces bruxellensis* ВКМ Y-3064D. Все штаммы микроорганизмов депонированы в Всероссийской коллекции микроорганизмов. Микробный консорциум получали путем совместного культивирования молочнокислых

бактерий, энтерококка и дрожжей в жидкой питательной среде MRS следующего состава (г/л): пептон ферментативный – 10,0; экстракт пекарных дрожжей – 4,0; твин-80 – 1,0 мл; мясной экстракт – 8,0; глюкоза – 20,0; калий фосфорнокислый однозамещенный – 2,0; натрий уксуснокислый 3-водный – 5,0; аммоний лимоннокислый однозамещенный – 2,0; магний сернокислый 7-водный – 0,1; марганец хлористый 4-водный – 0,05; pH среды – 6,3; режим стерилизации: 0,75 атм, 20 мин. Среда MRS специально разработана для культивирования молочнокислых бактерий, которые обитают в условиях пониженного pH (во рту, кишечнике и желудке) и адаптированы к кислотному стрессу. Культивирование микроорганизмов проводили в биореакторе Minifors 2 объемом 4 л (Minifors 2 НТ, Швейцария) при температуре 32 °С и 50 об/ мин в течение 3-х суток, что способствует формированию биопленок, адаптации к стрессу (включая pH) и активации генов устойчивости, в том числе к кислотности. Учет численности микроорганизмов в консорциуме проводили методом предельных разведений. Биологическая концентрация бактерий микробного консорциума составила $1,3 \cdot 10^9$ КОЕ.

Введение исследуемых веществ перорально через желудочный зонд представляет собой метод ввода веществ непосредственно в желудок. Таким путем обеспечивается точный контроль дозировки и время введения, также гарантируется, что вещество попадает в желудок без потерь на этапе прохождения через желудочно – кишечный тракт.

Кратность введения пробиотика составляла 1 раз в сутки по 3 мл на протяжении 21 дня.

2.5. Методы исследования двигательной активности

Поведенческий тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) (рисунок 2.4) считается как один из самых чувствительных моделей для исследования тревожности у животных. В тесте ПКЛ оценивается

двигательная активность, скорость ориентировочный реакций, степень выраженности эмоциональной реакции страха и тревоги.



Рисунок 2.4 – Приподнятый крестообразный лабиринт

Лабиринт представляет собой конструкцию, состоящую из центральной площадки, двух «открытых рукавов» размером 50x10 см и двух «закрытых рукавов» 50x10 см с открытым верхом, расположенных перпендикулярно относительно друг другу. Высота над полом составляет 1 м. Во время теста крысу помещают в центр и фиксировали пребывание животного в открытых и закрытых участках лабиринта. Время эксперимента составляет 3 мин 15 сек. В качестве основных показателей исследовали (таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Основные показатели индекса тревожности, которые зарегистрировали у крыс в системе «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Показатель	Значение
Число выходов в открытые рукава	Количество раз, когда крыса выходит в открытые рукава
Число выходов в закрытые рукава	Количество раз, когда крыса выходит в закрытые рукава
Время пребывания в открытых рукавах	Время (в секундах или минутах), проведённое крысой в открытых рукавах
Время пребывания в закрытых рукавах	Время (в секундах или минутах), проведённое крысой в закрытых рукавах
Процентное соотношение числа выходов в открытые рукава к общему числу выходов	$(\text{Число выходов в открытые рукава} / \text{Общее число выходов}) \times 100\%$
Процентное соотношение времени пребывания в открытых рукавах к общему времени	$(\text{Время в открытых рукавах} / \text{Общее время пребывания}) \times 100\%$

Автоматическая обработка данных проводилась в программе EthoVision ХТ (Noldus, Нидерланды) Это программное обеспечение для анализа поведения животных, в том числе время пребывания животного в открытых и закрытых рукавах, одновременно с этим фиксируют количество заходов в закрытые и открытые рукава, а также длительность нахождения в центральной зоне.

2.6. Методика проведения биохимического скрининга у крыс

На 22-е сутки после введения ПМК животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом с соблюдением правил эвтаназии. Кровь забирали для биохимического анализа, который провели автоматическим методом при использовании набора химических реактивов производства Mindray на анализаторе Mindray BS-800. Сыворотка крыс вводилась в специальные кюветы с использованием автоматического дозатора. Аппарат выполнял автоматический анализ образцов, включая

подготовку, смешивание с реагентами и оптическое измерение результатов (фотометрия). Результаты анализов автоматически регистрировались в базе данных прибора.

Комплексное исследование биохимических показателей крови включало определение показателей углеводного (глюкоза, ммоль/л), белкового (общий белок, г/л; альбумин, г/л; ЦРБ (С-реактивный белок), мг/л), азотистого обменов (мочевина, ммоль/л; креатинин, мкмоль/л; мочевая кислота, мкмоль/л), ферментов печени, поджелудочной железы и других органов (аланинаминотрансфераза (АЛТ), ед/л; аспартатаминотрансфераза (АСТ), ед/л; щелочная фосфатаза (ЩФ), ед/л; альфа-амилаза, ед/л; лактатдегидрогеназа (ЛДГ), ед/л), липидного обмена (холестерин, ммоль/л; триглицериды (ТГ), ммоль/л; липопротеины низкой плотности (ЛПНП), ммоль/л; липопротеины высокой плотности (ЛПВП), ммоль/л).

Изучение биохимических показателей крови крыс при введении ПМК на фоне аллоксанового диабета является актуальным, так как это позволяет углубить понимание патогенеза диабета и оценить терапевтический потенциал ПМК.

2.7. Методика морфометрического анализа внутренних органов крыс

Подготовка гистологического материала осуществлена в ЦКП «Молекулярная биология» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского».

Выбор методов и приемов микроскопирования осуществлялся согласно рекомендациям [27]. Гистологические препараты готовили в соответствии со стандартными методиками.

2.7.1. Методика морфометрического анализа печени

Морфометрические показатели печени являются важными диагностическими параметрами, позволяющими оценить степень поражения органа при СД. Данный анализ проводили также в программе Aperio Imagescope при увеличении в 8 и 10 раз на срезах толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином Джилла и эозином, используя метод наложения точечных морфометрических сеток. Определяли относительные площади сети синусоидов, ядер и цитоплазмы гепатоцитов, численные плотности двуядерных паренхиматозных клеток; рассчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение. Измеряется данные показатели в 5–10 полях зрения, рассчитывается среднее значение (рисунок 2.5).

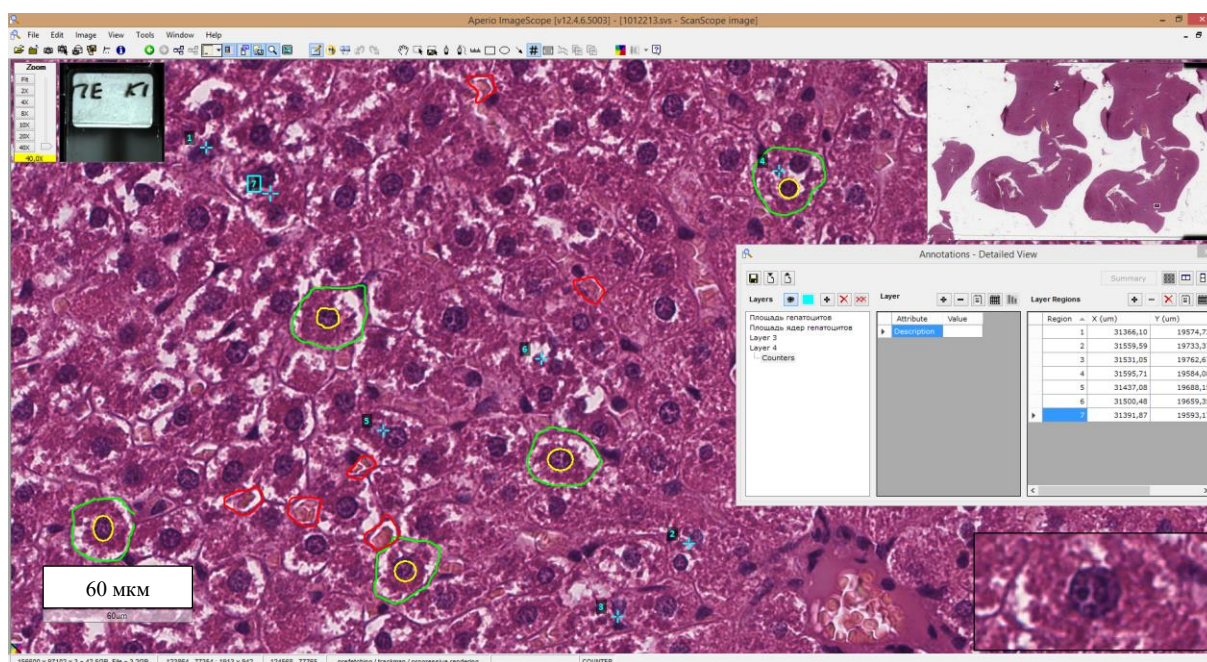


Рисунок 2.5 – Измерения морфометрических показателей печени крыс в программе Aperio Imagescope (ув. x40)

Данная методика позволяет количественно оценить изменения печени при сахарном диабете и других патологиях.

2.7.2. Методика морфометрического анализа почек

Морфометрические показатели почек при СД используются для оценки степени повреждения почечной ткани (изменения размеров почек, площади клубочков, канальцев и капиллярных петель указывают на структурные нарушения, вызванные диабетической нефропатией), фильтрационной функции почек, состояния канальцевого аппарата (уменьшение диаметра проксимальных и дистальных канальцев указывает на их атрофию и уменьшении реабсорбционной способности почек), интерстициальных изменений (изменение мочевого пространства позволяет оценить процессы воспаления, фиброза или отека, характерные для диабетической нефропатии); гипертрофии и гиперплазии структур почек (выражаются в увеличении толщины коркового и мозгового вещества, собирательных трубочек).

Измерение в программе Aperio Imagescope проводили следующих показателей: длина и ширина правой и левой почки (мкм); ширина коркового и мозгового вещества (мкм), площади клубочка с капсулой, капиллярных петель с интерстициальным пространством клубочка, мочевого пространства (мкм²); диаметр (мкм) и площадь (мкм²) просвета проксимальных канальцев и дистальных канальцев, диаметр (мкм) и площади просвета (мкм²) собирательных трубочек и тонкого сегмента петли Генле; количество почечных телец на единицу площади (у. е.). Измерение высоты, толщины почки, коркового и мозгового вещества, проводили на увеличении $\times 2$ с помощью (рисунок 2.6).

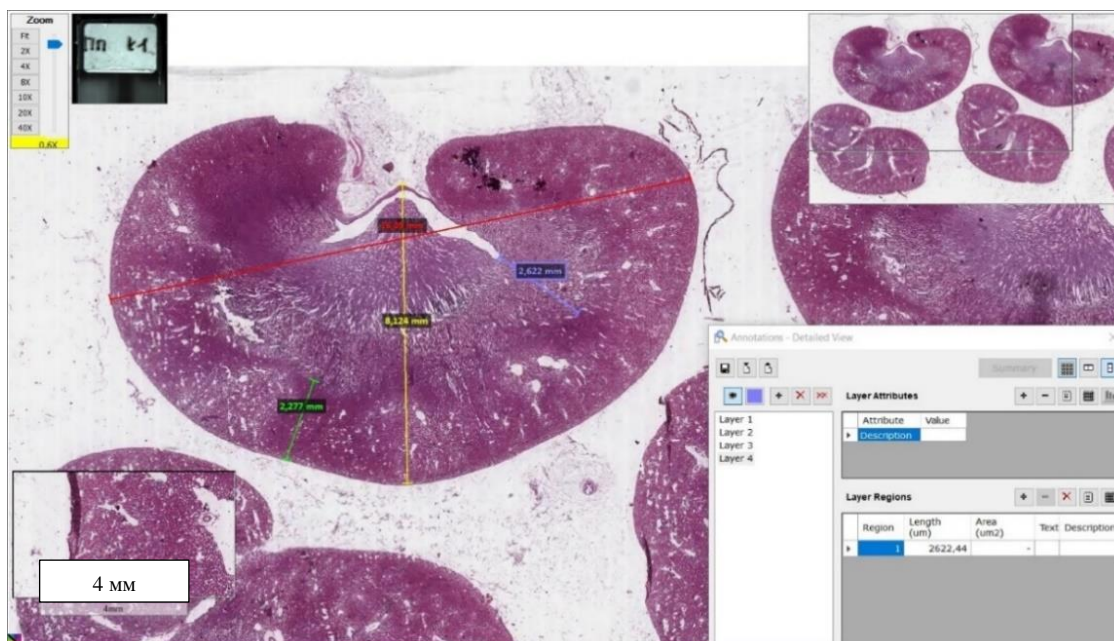


Рисунок 2.6 – Измерение высоты, толщины почки, коркового и мозгового вещества в программе Aperio Imagescope (ув. x2)

Корковое вещество почек представлено почечными (мальпигиевыми) тельцами - капиллярными клубочками, окруженными париетальным и висцеральным листками капсулы Шумлянско-Боумена и мочевым интерстициальным пространством, а также извитыми почечными канальцами нефрона – проксимальными (крупные канальцы с узким неровным просветом, клетки кубической формы, на апикальной поверхности которых щётчатая каёмка, в базальной части – исчерченность) и дистальными (диаметр меньше, а просвет шире и более ровный, чем у проксимальных канальцев, эпителий низкий призматический) (рисунок 2.7). Мозговое вещество представлено почечными пирамидами, образованные собирательными трубочками (по диаметру самые крупные среди всех канальцев, однослойный высокий призматический эпителий) и прямыми участками нефронов, в которых визуализировались единичные тонкие сегменты петли Генле (малый диаметр и очень тонкая стенка, что придаёт мозговому веществу ячеистую структуру).

В мозговом веществе оценивали морфометрические критерии собирательных трубочек и тонких сегментов почек крыс (рисунок 2.8).

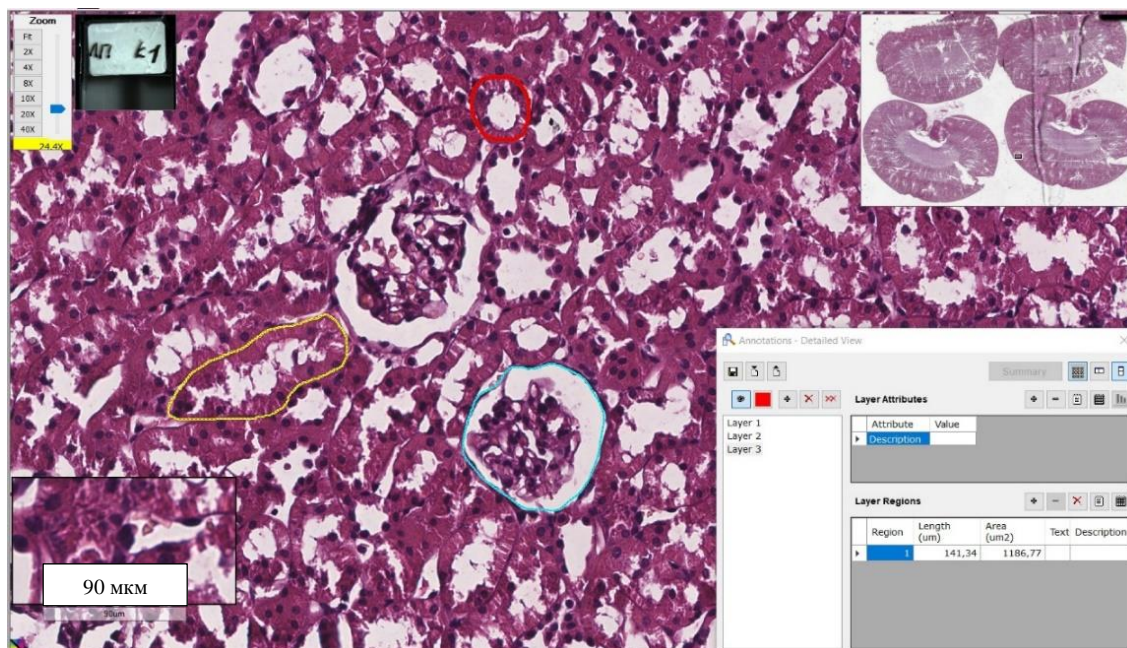


Рисунок 2.7 – Измерение показателей коркового вещества почек крыс в программе Aperio Imagescope (ув. x20)

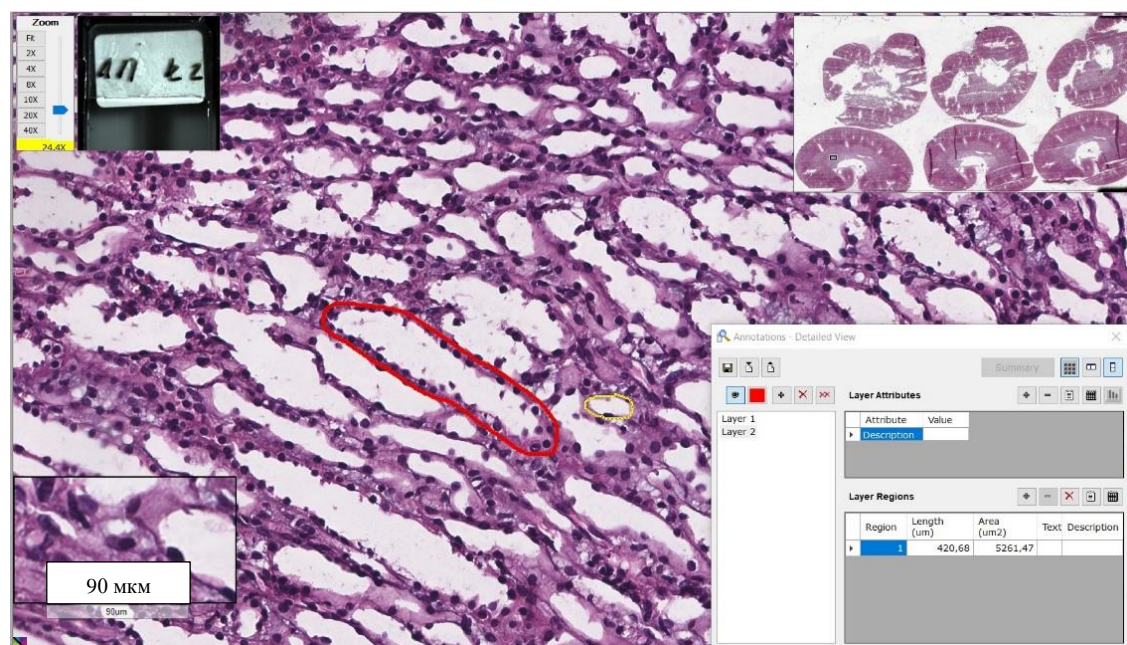


Рисунок 2.8 – Измерение показателей мозгового вещества почек крыс в программе Aperio Imagescope (ув. x20)

Эти показатели помогают выявить характерные для диабета структурные изменения, такие как диабетическая нефропатия, а также оценить динамику эффективности лечебных мероприятий.

2.7.3. Методика морфометрического анализа кишечника

Морфометрические показатели кишечника при СД используются для оценки изменений, связанных с диабетической энтеропатией, включающее дегенеративные и структурные нарушения в слизистой оболочке, такие как воспаление, атрофия и нарушение микроциркуляции.

В программе Aperio Imagescope на малом увеличении x8 линейкой измеряется толщину всей слизистой оболочки (по 3-5 измерений с каждого фото), высоту (от основания до верхушки) и толщину (в средней части) ворсин (рисунок 2.9).

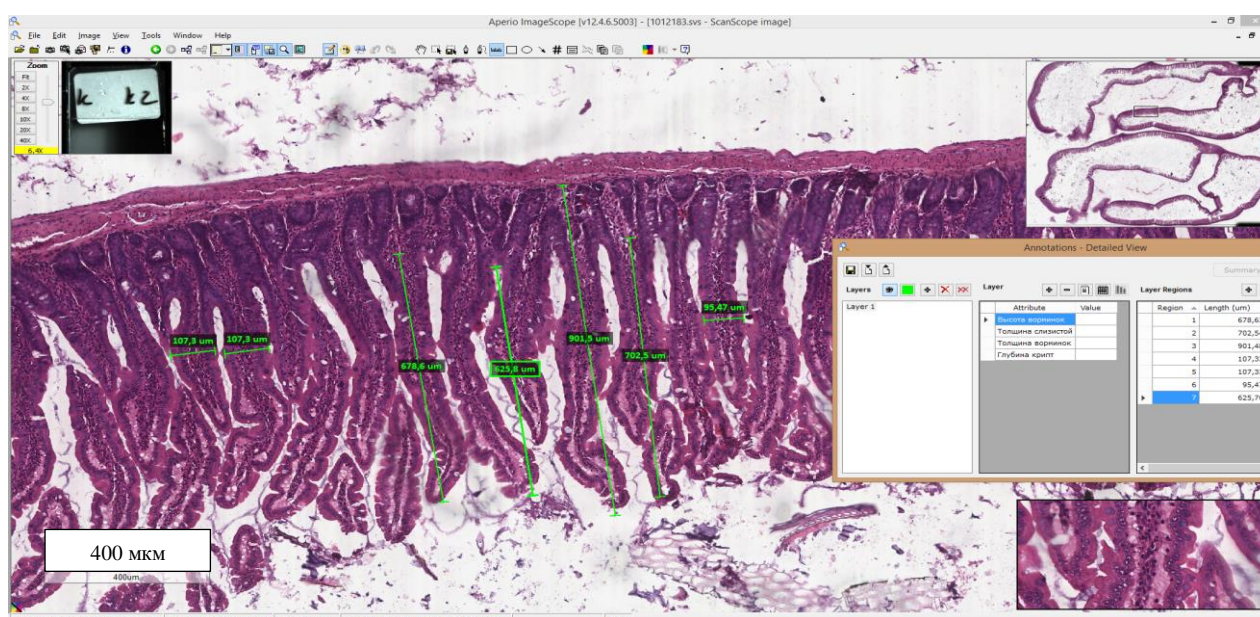


Рисунок 2.9 – Измерения морфометрических показателей слизистой кишечника крыс в программе Aperio Imagescope (ув. x8)

На большом увеличении 40x линейкой измеряется высота эпителиоцитов (3-5 измерений с каждого фото), подсчитываем число

железистых бокаловидных клеток в поле зрения (с большими пузырями в цитоплазме от прозрачного до сиреневого цвета) (рисунок 2.10).

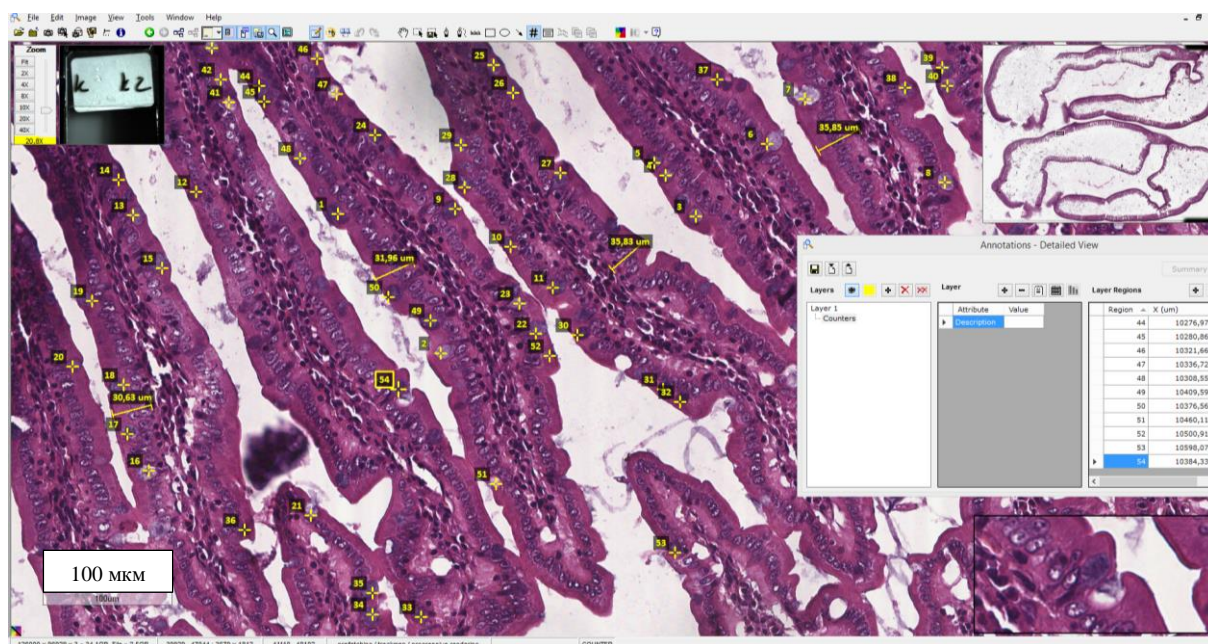


Рисунок 2.10 – Измерения морфометрических показателей ворсинок слизистой кишечника крыс в программе Aperio Imagescope (ув. x10)

Морфометрические исследования позволяют объективно структурные изменения кишечника при различных патологических состояниях и оценить влияние пробиотиков на ткани кишечника.

2.8. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку и графическое представление экспериментальных данных проводили с использованием программ GraphPad Prism 8 (версия 8.4.3 (686) (GraphPad Software, США) и Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США). Проверку распределения данных на нормальность осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Поскольку распределение данных в подавляющем большинстве случаев не соответствовало нормальному, значимость различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса. Множественные апостериорные сравнения значений показателей между

группами проводили с помощью критерия Данна (Bonferroni-Dunn post hoc test, Dunn's multiple comparison post-test). В таблице, на рисунках и в тексте значения показателей для соответствующей группы крыс представлены в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей (Me (Q₂₅:Q₇₅)). В описании сравнения значений показателей в разных группах животных использовались %, которые рассчитывались по значениям медианы показателей соответствующих групп. Критический уровень значимости статистических гипотез (p) в данном исследовании принимали равным 0,05.

2.9. Соблюдение этических стандартов

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям этического комитета по биоэтике ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» (протокол № 5 от 2022 г.).

Работа выполнялась в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» при кафедре физиологии человека и животных и биофизики ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского».

РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

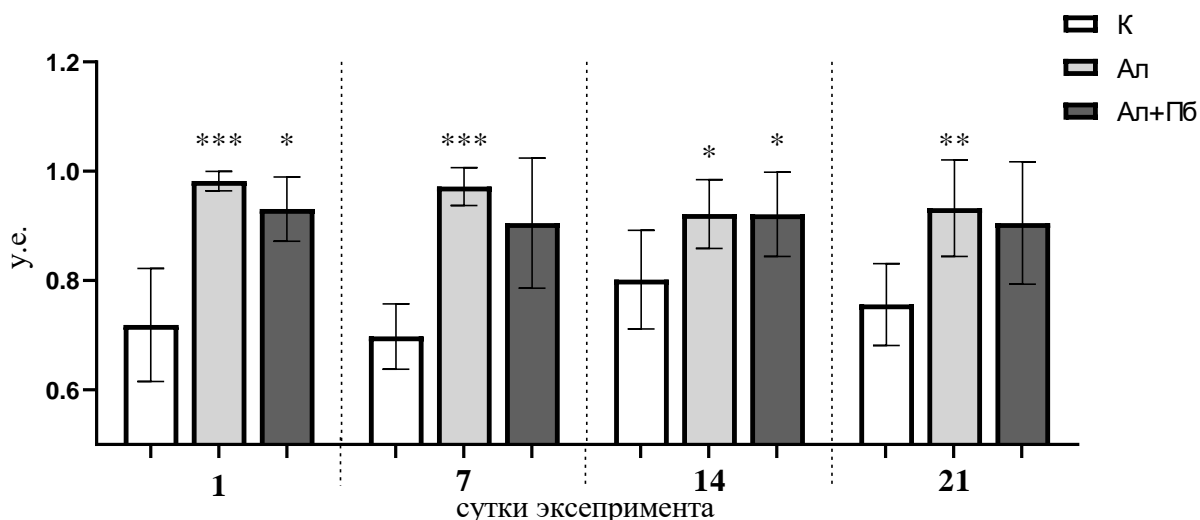
3.1. Изучение тревожности крыс с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Анализ результатов исследования показал, что на протяжении всего эксперимента отмечается увеличение ИТ во всех экспериментальных группах (рисунок 3.1). Так, во второй группе (Ал) на 1-е сутки отмечается увеличение ИТ на 32,0 % ($p < 0,001$) по сравнению с контролем, что указывает на значительный рост тревожности, что связано с возникновением гипергликемии и нейротоксического эффекта. На 7-е сутки ИТ вырос на 30,6 % ($p < 0,001$), относительно контрольных значений, что свидетельствует о продолжающихся нарушениях в организме. К этому моменту у крыс могут появляться более выраженные метаболические нарушения, такие как дисфункция центральной нервной системы. На 14-е и 21-е сутки изучаемый показатель увеличился на 23,0 % ($p < 0,01$) и 30,0 % ($p < 0,01$) соответственно по сравнению с контрольной группой (таблица 3.1, рисунок 3.1).

Таблица 3.1 – Индекс тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс при моделировании аллоксан-индуцированного диабета и при дополнительном введении пробиотического микробного консорциума

Сутки	Экспериментальные группы		
	К (1)	Ал (2)	Ал+Пб (3)
1	0,73 (0,64; 0,78)	0,99 (0,96; 0,99) $p_{1,2}=0,0006$	0,93 (0,89; 0,99) $p_{1,3}=0,02$
7	0,71 (0,65; 0,74)	0,98 (0,95; 0,99) $p_{1,2}=0,0006$	0,94 (0,89; 0,97)
14	0,78 (0,72; 0,89)	0,91 (0,86; 0,99) $p_{1,2}=0,006$	0,94 (0,83; 0,99) $p_{1,3}=0,004$
21	0,75 (0,70; 0,78)	0,96 (0,88; 0,99) $p_{1,2}=0,009$	0,93 (0,86; 0,98)

Примечание: Указаны медиана, нижний и верхний квартили (Ме (Q25:Q75))., $p < 0,05$ – достоверность различий в сравнении со значениями контрольной группы животных по критерию Краскелла – Уолиса.



Примечание: * – достоверность различий по критерию Данна относительно значений контрольной группы (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$)

Рисунок 3.1 – Изменение индекса тревожности крыс с аллоксан-индуцированным диабетом и при дополнительном введении пробиотического микробного консорциума в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Данные результаты, подтверждают литературные сведения о патогенетической роли гипергликемии и окислительного стресса в развитии тревожных расстройств при диабете.

При дополнительном введении ПМК в модели аллоксанного диабета у животных третьей группы (Al+Пб) на 1-е сутки наблюдается увеличение ИТ на 24,0 % ($p < 0,05$) относительно значений в контрольной группе, что в свою очередь меньше на 8,0 %, чем в группе Ал, что говорит о защитном эффекте ПМК, которому удается частично компенсировать негативное влияние аллоксана. На 7-е и 21-е сутки отмечается лишь тенденция к увеличению ИТ на 25,0 % и 26,0 % соответственно относительно показателей контрольной группы. На 14-е сутки введения ПМК отмечается наибольшее увеличение ИТ в третьей группе животных на 27,0 % ($p < 0,01$) относительно данных контрольной группы. Это указывает на продолжающееся отрицательное

воздействие аллоксана, но с меньшей силой, чем во второй группе (рисунок 3.1).

Таким образом, ПМК обладает антиоксидантными, противовоспалительными и нейропротекторными свойствами, что помогает частично возмещать отрицательное воздействие аллоксана. Это проявлялось в большей предпочтительности находиться в открытых «рукавах» и центре крестообразного лабиринта, что объясняет меньший уровень тревожности у крыс группы Ал+Пб по сравнению с крысами в группе Ал. Исследования в данной области имеют важное значение, так как они свидетельствуют о том, что ПМК оказывают умеренно анксиолитическое действие, благодаря взаимосвязи между кишечником и головным мозгом.

3.2. Изменение биохимического анализа крови крыс с аллоксан-индуцированным диабетом под влиянием пробиотического микробного консорциума

Результаты исследования биохимических показателей крови крыс с аллоксан-индуцированным диабетом и после введения ПМК на фоне диабета показали значимые различия (таблица 3.2). У животных контрольной группы данные показатели находились в пределах нормативных значений [23].

Анализ биохимических показателей крови у крыс второй группы (Ал) показал значимое увеличение уровня глюкозы на 274,12 % ($p < 0,05$) относительно контроля (таблица 3.2, рисунок 3.2), что свидетельствует о развитии гипергликемии, характерной для модели СД. Уровень СРБ увеличился на 343,59 % ($p < 0,05$) в сравнении с данными контрольной группы животных, что может указывать на воспалительный процесс. Уровни общего белка и альбумина снизились незначительно (на 12,23 % и 17,20 % ($p < 0,05$) соответственно), что указывает на ухудшение белкового обмена и катаболизм. Показатели мочевины и креатинина увеличились на 91,63 % ($p < 0,05$) и 79,55

% ($p < 0,05$) относительно контроля, что указывает на нарушение азотистого обмена и снижение почечной функции.

Таблица 3.2 – Биохимические показатели крови крыс в контроле (К), с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) при введении пробиотического микробного консорциума (Ал+Пб)

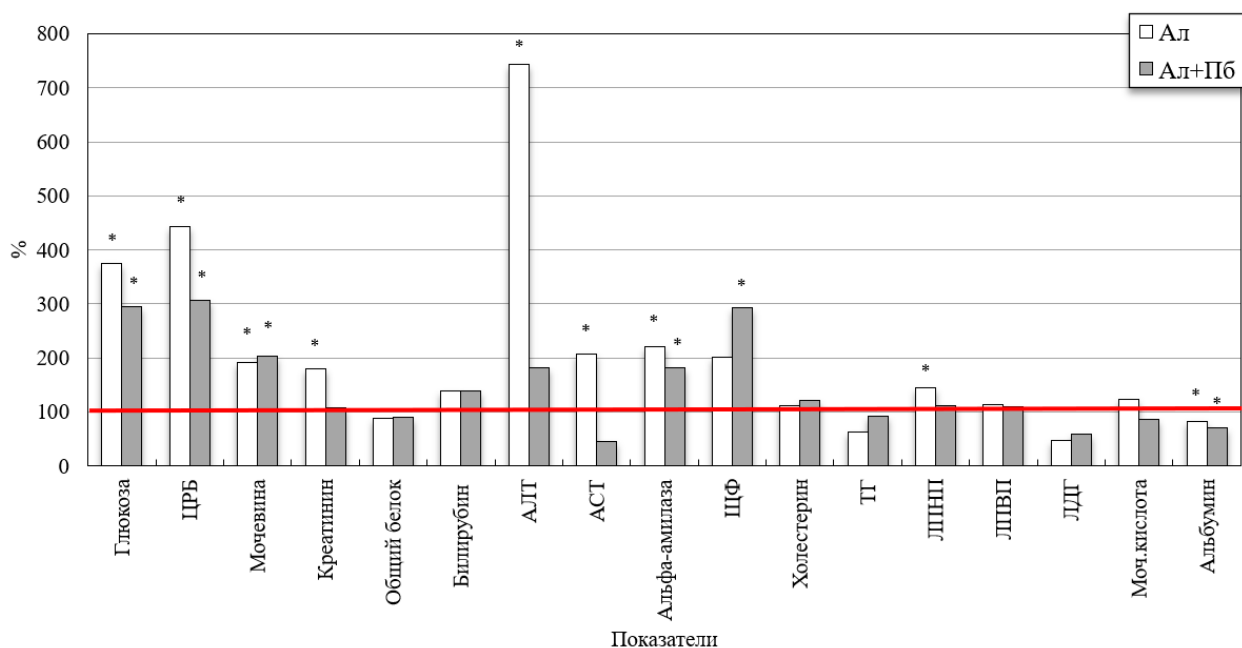
Показатели	Экспериментальные группы		
	К	Ал	Ал + Пб
1	2	3	4
Глюкоза, моль/л	5,10 (5,01; 5,17)	19,08 (16,97; 24,83) $p < 0,05$	15,08 (9,71; 17,72) $p < 0,05$
СРБ	7,80 (5,20; 9,80)	34,60 (28,70; 39,60) $p < 0,05$	23,90 (18,70; 25,90) $p < 0,05$
Мочевина, ммоль/л	7,65 (7,32; 8,47)	14,66 (13,50; 15,43) $p < 0,05$	15,51 (15,43; 17,48) $p < 0,05$
Креатинин, мкмоль/л	39,60 (37,60 40,60)	71,10 (69,30; 84,30) $p < 0,05$	42,40 (37,60; 69,30)
Общий белок, г/л	65,40 (63,40; 67,00)	57,40 (50,80; 61,80)	59,20 (54,70; 60,20)
Билирубин общий, мкмоль/л	1,05 (1,05; 1,58)	1,45 (0,99; 1,53)	1,45 (1,38; 1,53)
Аланинаминотрансфераза (АЛТ), ед/л.	141,60 (118,00; 161,60)	1053,30 (696,40; 1108,40) $p < 0,05$	256,70 (124,70; 296,60)
Аспаргатаминотрансфераза (АСТ), ед/л.	521,80 (531,20; 558,30)	1077,50 (503,60; 2166,00) $p < 0,05$	236,20 (233,60; 1113,10)
Альфа-амилаза, ед/л.	614,00 (545,40; 714,00)	1358,88 (882,90; 1532,80) $p < 0,05$	1109,9 (1076,80; 1487,00) $p < 0,05$
Щелочная фосфатаза (ЩФ), ед/л.	348,40 (248,20; 706,20)	699,30 (515,40; 1218,10)	1021,00 (695,20; 1354,00) $p < 0,05$

Продолжение таблицы 3.2

1	2	3	4
Холестерин, моль/л	1,13 (1,11; 1,22)	1,26 (1,10; 1,31)	1,36 (1,25; 1,39)
Триглицериды (ТГ), ммоль/л	1,46 (0,97; 1,85)	0,91 (0,59; 1,06)	1,34 (1,22; 1,40)
Лipoproteины низкой плотности (ЛПНП), ммоль/л	0,25 (0,20; 0,30)	0,36 (0,35; 0,48) p < 0,05	0,28 (0,19; 0,47)
Лipoproteины высокой плотности (ЛПВП), ммоль/л	0,58 (0,43; 0,78)	0,66 (0,54; 0,81)	0,63 (0,54; 0,63)
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), ед/л.	3156,80 (2543,00; 3676,80)	1486,30 (1180,70; 2244,10)	1859,90 (1194,90; 3662,00)
Мочевая кислота, мкмоль/л	228,20 (218,10; 239,80)	280,40 (246,50; 312,30)	197,70 (186,60; 306,10)
Альбумин, г/л	31,40 (30,10; 32,40)	26,00 (20,00; 27,40) p < 0,05	22,20 (20,00; 24,90) p < 0,05

Примечание: Указаны медианы и нижнего и верхнего квартилей (Me (Q25:Q75)).
p<0,05 – достоверность различий в сравнении со значениями контрольной группы животных по критерию Данна.

Отмечается увеличение АЛТ (на 643,85 %; p<0,05) и АСТ (на 106,50 %; p<0,05) относительно контроля (таблица 3.2, рисунок 3.2), что указывает на выраженную печеночную дисфункцию. Уровень α -амилазы увеличился на 121,32 % (p<0,05), что связано с гиперактивностью поджелудочной железы. Значения ЩФ увеличились на 100,72 % в сравнении с данными контрольной группы животных. Уровни холестерина и ЛПНП увеличились на 11,50 % и на 44,00 % (p<0,05) в сравнении с контролем, а ЛДГ снизился на 52,92 % (таблица 3.2, рисунок 3.2), что может быть связано с энергетическим дисбалансом.



Примечание: * статистически значимое отличие по критерию Данна относительно значений показателей у крыс контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 3.2– Изменение биохимических показателей крови крыс с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) и при курсе введения пробиотического микробного консорциума (Ал+Пб) (в сравнение с показателями контрольной группой животных, принятых за 100%)

У крыс третьей группы (Ал+Пб) уровень глюкозы в крови был выше контроля на 195,69 % ($p < 0,05$), но ниже уровня у группы Ал на 20,96 % (таблица 3.2, рисунок 3.2), что показывает гипогликемическое действие ПМК. СРБ на 206,41 % ($p < 0,05$) выше контроля, при этом на 30,92 % ниже, чем у животных второй группы (Ал), что свидетельствует о выраженном противовоспалительном эффекте ПМК. Уровень мочевины и креатинина увеличился на 102,75% ($p < 0,05$) и на 7,07% в сравнении с показателями у животных контрольной группы. Мочевая кислота снизилась до уровня контрольных значений. Восстановление уровня общего белка свидетельствует о частичном восстановлении белкового метаболизма. Уровень общего билирубина был выше контроля на 38,09 %, АЛТ – на 81,29 %, АСТ ниже на 54,73 % относительно контроля действие ПМК. Уровень α -амилазы незначительно снизился на 18,32 % относительно значений у крыс группы Ал

(на 80,77 % ($p < 0,05$) выше контроля), что указывает на частичное восстановление. Уровень ЩФ увеличился на 193,05 % ($p < 0,05$) в сравнении с контролем, что указывает на продолжающиеся метаболические нарушения. Уровни холестерина и ЛПНП увеличились на 20,35% и 12,00% в сравнении с контролем. Уровень ЛДГ уменьшился на 41,08% в сравнении с контролем, что указывает на частичное восстановление энергетического метаболизма (таблица 3.2, рисунок 3.2).

Результаты биохимического исследования свидетельствует о том, что аллоксан-индуцированный СД у крыс вызывает выраженные патологические изменения в обмене веществ, что согласуется с многочисленными литературными источниками. Увеличение уровня глюкозы в крови указывает на развитие тяжелой гипергликемии вследствие разрушения β -клеток поджелудочной железы. Рост уровня СРБ относительно контроля отражает развитие системного воспалительного ответа [42]. Снижение общего белка и альбумина также подтверждает катаболические процессы, типичные для диабетического состояния, и ухудшение синтетической функции печени [24]. Значительное повышение уровня мочевины и креатинина свидетельствует о нарушении экскреторной функции почек, что может быть связано с ранними проявлениями диабетической нефропатии. Это согласуется с работой Vallianou N.G. и др. [84], в которых подчеркивается роль воспаления и оксидативного стресса в поражении почек при СД.

После введения ПМК в третьей группе крыс наблюдается положительная динамика: уровень глюкозы снижается по сравнению со второй группой (Ал), что указывает на умеренный гипогликемический эффект ПМК. Такие данные подтверждаются исследованиями Yadav H. и соавт. [90], в которых показано, что пробиотические штаммы могут улучшать гликемический контроль за счёт повышения чувствительности к инсулину и модуляции микрофлоры кишечника. Снижение СРБ по сравнению с ланными второй группой указывает на противовоспалительное действие пробиотиков.

Также наблюдается в восстановлении почечной функции: креатинин снижается по сравнению со значениями у второй группы животных, а уровень мочевой кислоты возвращается к контрольным значениям, что согласуется с литературными данными [47] о ренопротекторном действии метаболитов ПБ. Уровень общего белка практически восстанавливается, а активность АСТ снижается, что подтверждает гепатопротекторный эффект ПМК.

Таким образом, введение ПМК оказывает выраженное положительное влияние на биохимические показатели крови у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом, проявляя умеренный гипогликемический, противовоспалительный, гепатопротекторный и ренопротекторный эффекты.

3.3. Морфометрические показатели печени крыс с аллоксан-индуцированным диабетом при введении пробиотического микробного консорциума

Результаты анализа гистологических срезов печени крыс, подвергнутых введению курса ПМК на фоне аллоксан-индуцированного диабета, выявили значимые различия морфометрических показателей в сравнении с соответствующими показателями крыс в первой (К) и второй (Ал) групп.

У животных первой группы (К) при визуальном осмотре гистопрепарата отмечаются сохранение структуры печени, наблюдаются хорошо выраженные печеночные дольки, балки, сходящиеся к центральному сосуду (рисунок 3.3). Морфометрические показатели печени крыс контрольной группы представлены в таблице 3.3.

На гистосрезах печени крыс второй группы (Ал) на фоне аллоксанового диабета отмечается гепатоцитарная дистрофия, клетки увеличены, их форма и границы нарушены (рисунок 3.3). Цитоплазма гепатоцитов вакуолизирована (признаки жировой инфильтрации). Центральные вены и синусоиды расширены, что может свидетельствует о нарушении микроциркуляции. Присутствуют признаки воспалительной инфильтрации.

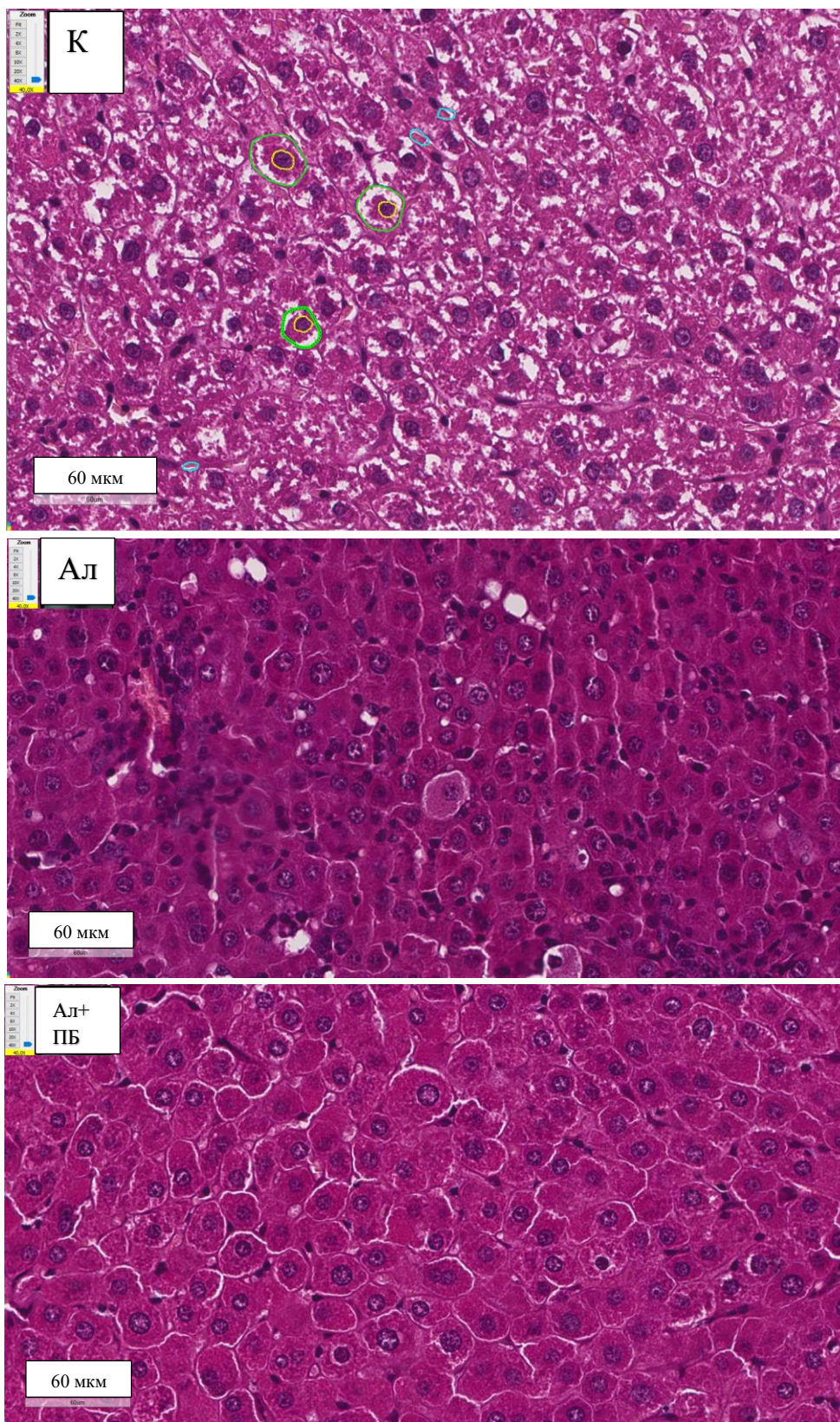


Рисунок 3.3 – Гистологические срезы печени крыс в контроле (К), с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) при введении пробиотического микробного консорциума (Ал+Пб) (ув. x40)

Таблица 3.3 – Морфометрические показатели печени крыс в контроле (К), с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) при введении пробиотического микробного консорциума (Ал+Пб)

Показатели	Экспериментальные группы		
	К (1)	Ал (2)	Ал+Пб (3)
Площадь гепатоцитов, мкм ²	389,13 (346,54; 476,25)	300,53 (223,13; 401,30) p _{1,2} =0,0001	335,16 (270,18; 437,66) p _{1,3} =0,0044
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	47,36 (42,07; 55,13)	48,18 (34,88; 82,250)	58,40 (48,16; 70,30) p _{1,3} =0,0026
Синусоид площадь, мкм ²	18,14 (13,22; 22,62)	24,18 (17,98; 33,49) p _{1,2} =0,0001	20,29 (14,99; 24,36) p _{2,3} =0,0314
Количество синусоидов, у.е.	23,00 (15,00; 35,50)	52,50 (41,75; 88,25) p _{1,2} =0,0001	38,50 (26,75; 65,75) p _{1,3} =0,0008 p _{2,3} =0,0302
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,13 (0,10; 0,17)	0,23 (0,16; 0,28) p _{1,2} =0,0001	0,21 (0,17; 0,24) p _{1,3} =0,0001

Примечание: Указаны медианы и нижнего и верхнего квартилей (Me (Q25:Q75)); p_{1,2}, p_{1,3}, p_{2,3} – уровень значимости отличий по критерию Данна между группами, обозначенными 1, 2, 3 соответственно.

Анализ морфометрических показателей печени крыс второй группы выявил значительное уменьшение площади гепатоцитов на 22,78% (p=0,0001) по сравнению с контрольной группой, что подтверждает дистрофические изменения клеток (таблица 3.3). Площадь ядра гепатоцитов, напротив, увеличилась незначительно (на 1,73%). Площадь синусоидов возросла на 33,30% (p=0,0001) в сравнение с контролем, что свидетельствует о нарушении микроциркуляции и возможном отеке. Количество синусоидов возросло более чем в два раза относительно контроля – до 52,50 у.е. (p=0,0001). Ядерно-цитоплазматическое отношение увеличилось также почти в два раза в сравнение с контролем, составив 0,23% (p=0,0001), что подтверждает изменения в гепатоцитах.

У животных третьей группы (Ал+Пб) на гистологических препаратах печени отмечаются частичное сохранение структуры печени. Гепатоциты имеют более чёткие границы, уменьшена степень вакуолизации по сравнению с второй группой Ал. Так, сосудистое русло менее расширено, признаки воспаления выражены слабо, дольки сохраняют свою структуру, хотя не полностью. Наблюдается умеренная компенсация нарушений, свидетельствующая о гепатопротекторном эффекте ПМК.

Морфометрические показатели печени крыс третьей группы после курса введения ПМК частично нормализовались по сравнению со второй группой, но изменения все еще присутствуют. Так, площадь гепатоцитов увеличена на 11,53% по сравнению со второй группой Ал, но на 13,87% ($p=0,0044$) ниже контрольных значений, что может свидетельствовать о восстановлении структуры печени при сохранении остаточных дистрофических изменений. Площадь ядер гепатоцитов увеличилась на 23,31% ($p=0,0026$) выше контрольных показателей. Площадь синусоидов уменьшилась на 16,43% ($p=0,0010$) по сравнению с данными показателями во второй группе, но была выше на 11,85% контрольных значений, что свидетельствует о постепенной нормализации микроциркуляции. Количество синусоидов также снизилось по сравнению со второй группой на 26,67% ($p=0,0008$), но все еще превышало показатели контрольных животных на 67,39% ($p=0,0302$). Ядерно-цитоплазматическое отношение уменьшилось до 0,21%, что ниже показателя второй группы, но все еще выше контрольных значений ($p=0,0001$), что свидетельствует о частичном восстановлении клеточного гомеостаза.

Таким образом, у крыс с аллоксановым диабетом наблюдаются выраженные дистрофические изменения печени. Введение курса ПМК вызывает частично защитный эффект, способствуя сохранению структурной организации печени и частичному восстановлению ее клеточного состава, однако они не полностью предотвращают повреждения, вызванные аллоксаном, о чем свидетельствует сохраняющееся увеличение ядерно-

цитоплазматического отношения и площади синусоидов. Снижение ядерно-цитоплазматического отношения, несмотря на его сохранение выше контрольных значений, свидетельствует о частичном неполном восстановлении клеточного гомеостаза и уменьшении гипертрофии ядер.

Таким образом, введение ПМК способствует снижению выраженности морфологических и морфометрических нарушений, вызванных аллоксановым диабетом, что подтверждает гепатопротекторные свойства пробиотиков в условиях диабетического поражения печени.

3.4. Морфометрические показатели почек крыс с аллоксан-индуцированным диабетом при введении пробиотического микробного консорциума

У животных первой группы (К) на гистологических срезах почек наблюдали нормальную картину строения коркового и мозгового вещества почки (рисунок 3.4). Эти структурные элементы имели следующие морфометрические параметры, представленные в таблице 3.4.

У животных второй группы отмечается выраженная деструкция клубочков, увеличение интерстициального пространства, деформация капилляров (рисунок 3.4). Значительное расширение канальцев, особенно проксимальных, что может свидетельствовать об атрофии эпителия и нарушении реабсорбции. Выявлены вакуолизации и дистрофические изменения в канальцевом эпителии, а также умеренный интерстициальный отек и признаки воспаления.

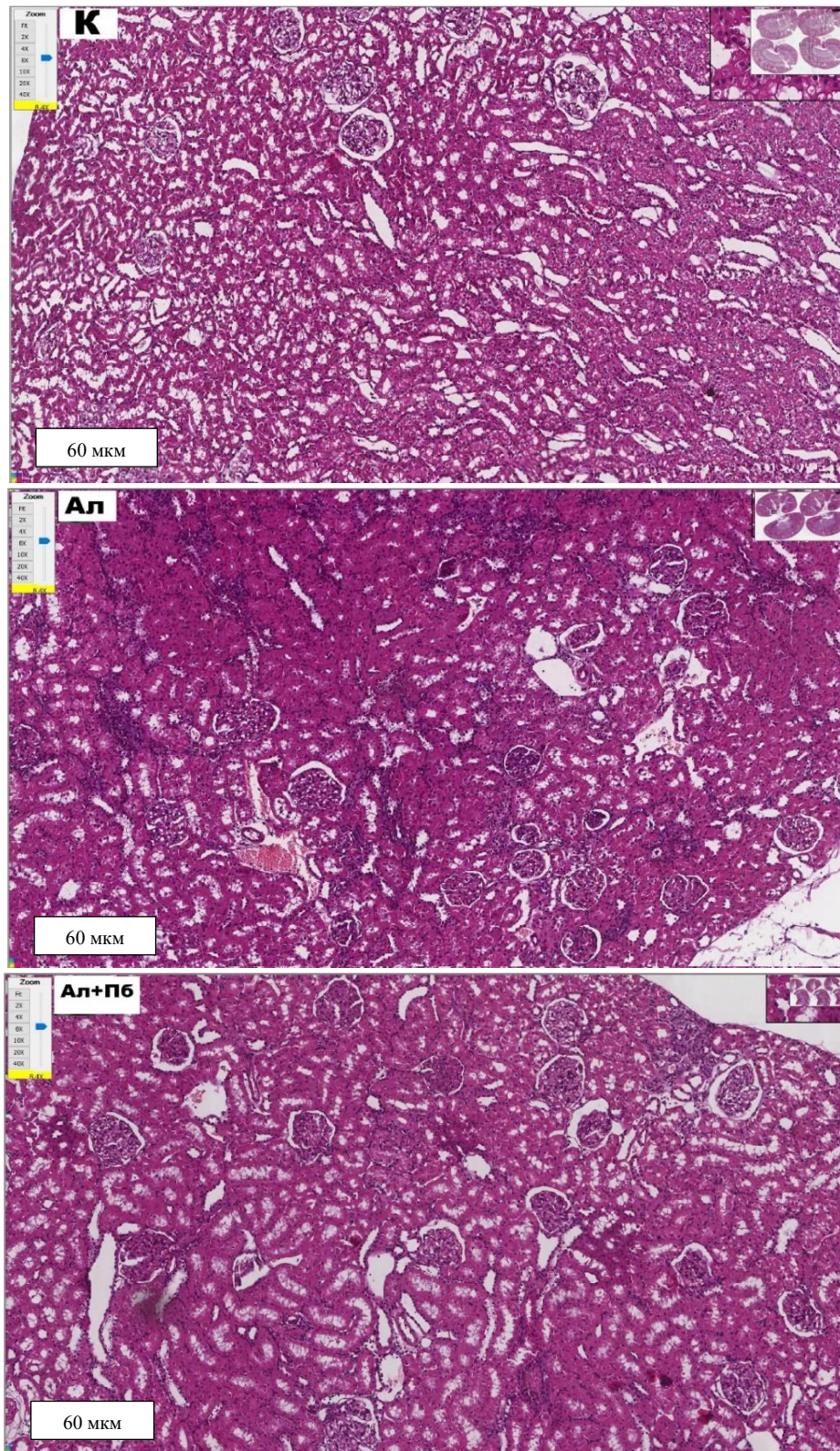


Рисунок 3.4 – Гистологические срезы коркового вещества почек крыс в контроле (К), с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) при введении пробиотического микробного консорциума (Ал+Пб) (ув. x10)

Таблица 3.4 – Морфометрические показатели почек крыс в контроле (К), с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) при введении пробиотического микробного консорциума (Ал+Пб)

Показатели	Экспериментальные группы		
	К (1)	Ал (2)	Ал+Пб (3)
1	2	3	4
Длина правой почки, мкм	15809,30 (14606,38; 18639,17)	18036,97 (16729,37; 18639,17)	16976,32 (16227,86; 17387,85)
Длина левой почки, мкм	15820,09 (15084,33; 16247,56)	18183,03 (17726,86; 18574,21) $p_{1,2}<0,0031$	19342,23 (17718,54; 19582,90) $p_{1,3}<0,0002$
Толщина правой почки, мкм	8141,91 (7753,26; 9689,01)	8994,90 (8652,07; 9483,52)	10674,60 (10375,77; 10926,57) $p_{1,3}<0,0041$ $p_{2,3}<0,0115$
Толщина левой почки, мкм	9527,91 (9307,54; 9715,98)	9456,16 (8575,02; 9850,72)	10513,45 (10249,24; 11005,06) $p_{1,3}<0,0107$ $p_{2,3}<0,0030$
Толщина коркового вещества, мкм	2602,63 (2434,21; 2928,95)	2381,84 (1994,13; 2694,36) $p_{1,2}<0,0016$	2768,44 (2572,79; 3035,45) $p_{2,3}<0,0001$
Толщина мозгового вещества, мкм	3529,72 (2297,75; 4104,13)	2906,55 (1927,65; 4017,41)	3336,77 (2752,57; 4161,79)
Площадь клубочка с капсулой, мкм ²	10771,00 (9293,46; 12674,20)	8628,29 (6748,92; 10238,19) $p_{1,2}<0,0001$	12669,52 (9789,26; 15708,16) $p_{2,3}<0,0001$

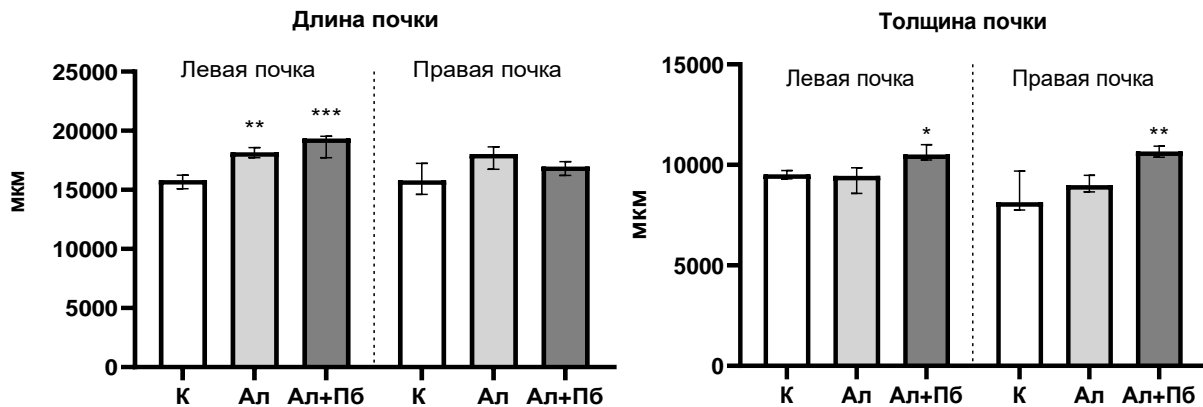
Продолжение таблицы 3.4

1	2	3	4
Площадь капиллярных петель клубочка, мкм ²	6084,95 (5245,07; 7123,35)	6469,43 (4545,29; 7690,67)	5947,02 (4250,64; 7977,01)
Площадь мочевого пространства в почечном тельце, мкм ²	4327,20 (3125,57; 6867,26)	2270,02 (301,73; 4775,58) p _{1,2} <0,0001	6371,96 (3060,20; 8914,81) p _{2,3} <0,0001
Площадь мочевого пространства в почечном тельце, мкм ²	4327,20 (3125,57; 6867,26)	2270,02 (301,73; 4775,58) p _{1,2} <0,0001	6371,96 (3060,20; 8914,81) p _{2,3} <0,0001
Площадь дистального извитого канальца, мкм ²	1351,76 (1109,30; 1544,23)	1483,20 (1221,29; 1709,88) p _{1,2} <0,04	1758,12 (1448,27; 1968,98) p _{1,3} <0,0001 p _{2,3} <0,0001
Площадь проксимального извитого канальца, мкм ²	4262,71 (3400,42; 5417,47)	3448,58 (2637,09; 4360,43) p _{1,2} <0,0015	6123,19 (4686,22; 7180,85) p _{1,3} <0,0001 p _{2,3} <0,0001
Площадь собирательной трубочки, мкм ²	6827,45 (4621,84; 10631,70)	1424,15 (852,76; 2028,27) p _{1,2} <0,0001	7661,23 (5756,99; 9475,34) p _{2,3} <0,0001
Площадь петли Генле, мкм ²	1358,90 (940,46; 2232,64)	1588,36 (1269,99; 2182,51)	1700,75 (1149,55; 2630,15) p _{1,3} <0,04
Количество почечных телец на единицу площади	26,00 (21,00; 33,75)	23,00 (22,00; 26,00) p _{1,2} <0,0001	20,00 (15,00; 24,75) p _{2,3} <0,016

Примечание: Указаны медианы и нижнего и верхнего квартилей (Me (Q25:Q75)); p_{1,2}, p_{1,3}, p_{2,3} – уровень значимости отличий по критерию Данна между группами, обозначенными 1, 2, 3 соответственно.

Анализ морфометрических показателей почек крыс второй группы выявил увеличение длины (правой – на 14,09%, левой – на 14,94%; p<0,003) и толщины почек (правой – на 10,48 %, левой не изменилась) в сравнение с

соответствующими показателями у крыс в контроле, что указывает на незначительную гипертрофии почек (таблица 3.4, рисунок 3.5). Толщина коркового вещества снизилась на 8,48 % ($p < 0,0016$), а мозгового – на 17,65 %, что может указывать на разрушение нефронов и потерю функциональной массы почки (рисунок 3.6, 3.7). В сравнение с контрольной группой уменьшилась площадь клубочка с капсулой Шумлянско-Боумена на 19,89 % ($p < 0,0001$), а также мочевого боуменово пространства – на 47,54 % ($p < 0,0001$), что указывает на повреждение фильтрационного аппарата почек. Площадь проксимальных извитых канальцев сократились на 19,01% ($p < 0,0001$) (см. таблица 3.4, рисунок 3.7), что свидетельствует об их атрофии и снижении реабсорбционной функции. Площадь собирательных трубочек мозгового вещества почек уменьшилась на 79,14% ($p < 0,0001$), а петли Генле, напротив, увеличилась на 16,89 % ($p < 0,02$) в сравнение с соответствующими показателями у крыс в контроле.



Примечание: на графике представлены значения в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей (Me (Q₂₅:Q₇₅)); * – статистически значимое отличие по критерию Данна относительно значений показателей у крыс контрольной группы (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$)

Рисунок 3.5 – Морфометрические показатели длины и толщины почек крыс в контроле (К), с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) при введении пробиотического микробного консорциума (Ал+Пб)

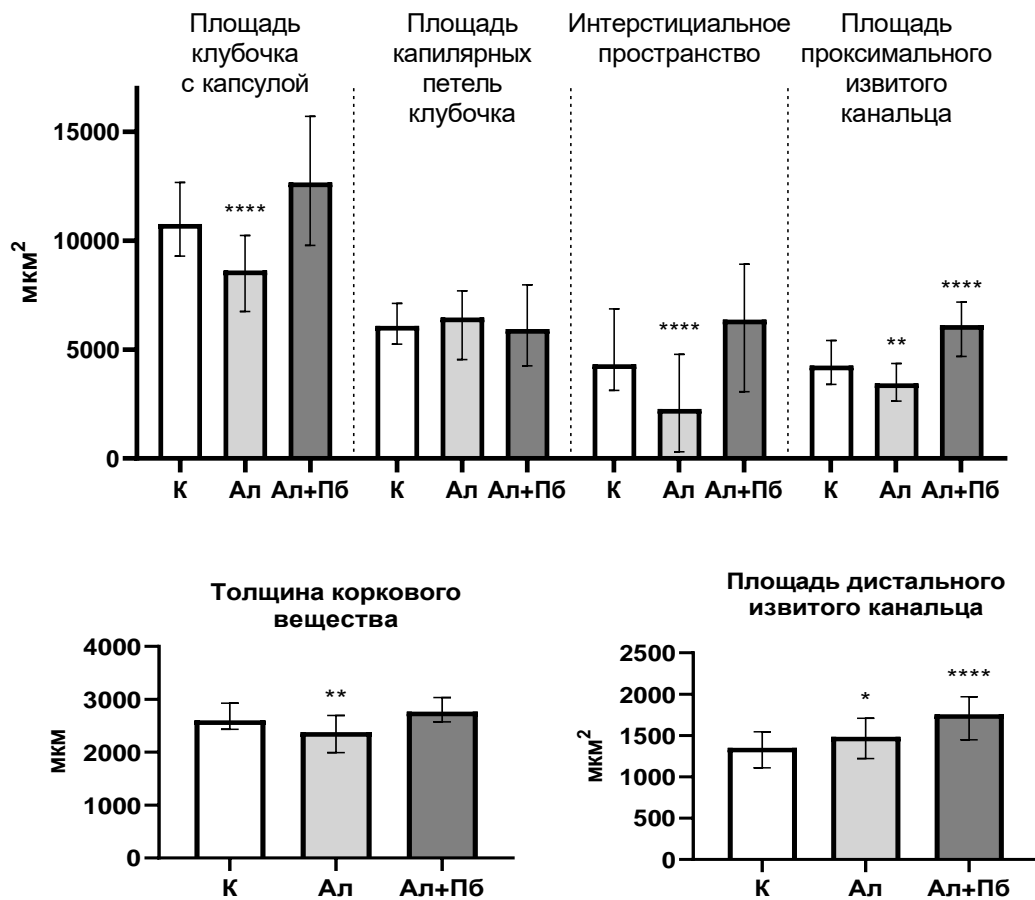
У крыс третьей группы (Ал+Пб) на гистосрезках почек также зарегистрированы признаки патологических изменений в корковом и мозговом веществах. Однако структура клубочков, их капиллярные сети более сохранены по сравнению со второй группой (Ал). Снижен уровень отека и воспалительных изменений в интерстициальном пространстве в сравнении с гистосрезом почек крыс во второй группе, подвергнутым введению только аллоксана (см. рисунок 3.4).

Анализ морфометрических показателей почек крыс третьей группы выявили на уровне тенденции увеличение длины почек (правой – на 7,38%, левой – на 22,26%; $p < 0,002$) в сравнении с контролем, но эти данные были ниже, чем во второй группе, что свидетельствует о частичной нормализации (см. таблица 3.4). Толщина почек заметно увеличена (правая – на 31,11% ($p < 0,0041$), левая на 10,34% ($p < 0,0107$)) в сравнении с контролем. Толщина коркового вещества восстановилась и была на уровне контрольных показателей. Площадь клубочка с капсулой Шумлянско-Боумана и боуменово пространства увеличились на 17,63% ($p < 0,0001$) и 47,25% ($p < 0,0001$) соответственно по сравнению с контролем, что свидетельствует об улучшении фильтрации. Количество почечных телец также частично восстановилось, увеличившись на 15,00 % ($p < 0,0016$) по сравнению со второй группой (Ал). Увеличились площади проксимальных (на 43,65%; $p < 0,0001$) и дистальных (на 30,06 %; $p < 0,0001$) извитых канальцев в сравнении с контролем, что говорит о восстановлении их функции.

Состояние собирательных трубочки также улучшились (площадь приблизилась к контрольным значениям), что говорит о нормализации экскреторной функции (см. таблицу 3.4).

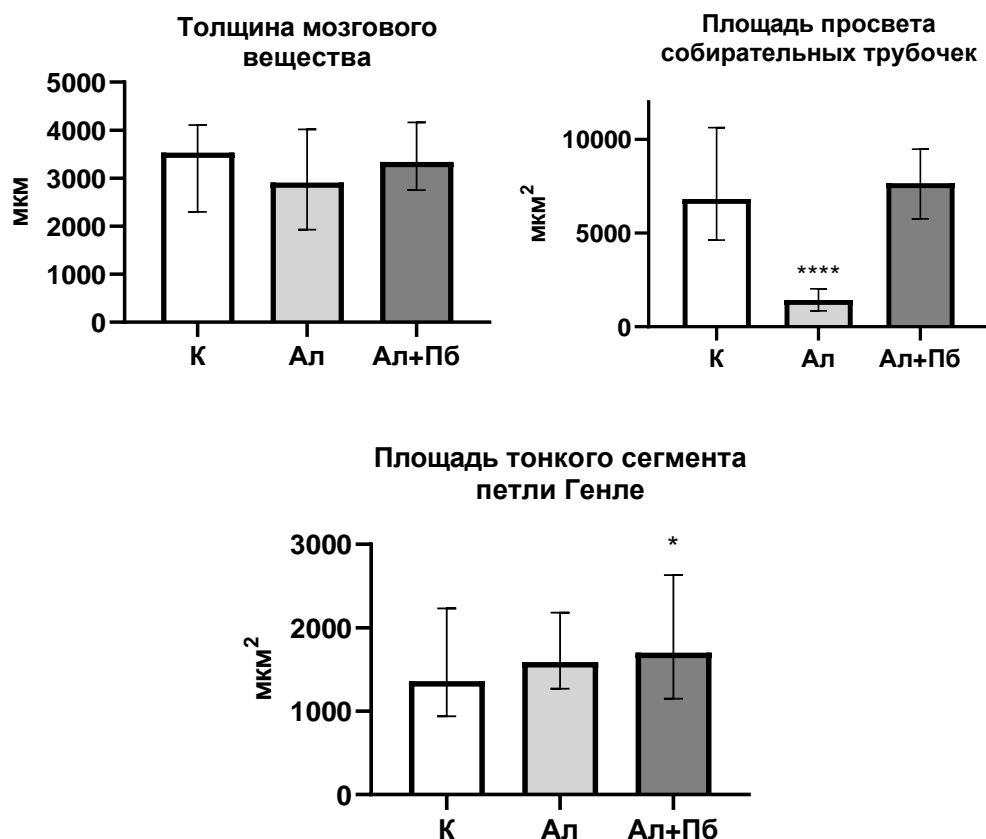
Полученные данные подтверждают, что аллоксан-индуцированный СД вызывает выраженные морфологические и морфометрические нарушения в почечной ткани, характерные для диабетической нефропатии. У крыс второй группы выявлены признаки выраженной деструкции: уменьшение площади

клубочков, сужение боуменова пространства, расширение канальцев, вакуолизация эпителия и наличие интерстициального отека. Эти изменения соответствуют описанным в ряде работ, где показано, что хроническая гипергликемия приводит к развитию микроангиопатий, деструкции фильтрационного барьера, потере нефронов и снижению реабсорбционной функции почек [17, 88].



Примечание: на графике представлены значения в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей (Me (Q₂₅:Q₇₅)); * – статистически значимое отличие по критерию Данна относительно значений показателей у крыс контрольной группы (* – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; **** – p<0,0001)

Рисунок 3.6 – Морфометрические показатели коркового вещества почек крыс в контроле (К), с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) при введении пробиотического микробного консорциума (Ал+Пб)



Примечание: на графике представлены значения в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей (Me (Q₂₅:Q₇₅)); * – статистически значимое отличие по критерию Данна относительно значений показателей у крыс контрольной группы (* – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; **** – p<0,0001)

Рисунок 3.7 – Морфометрические показатели мозгового вещества почек крыс в контроле (К), с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) при введении пробиотического микробного консорциума (Ал+Пб)

Уменьшение количества почечных телец, а также снижение толщины коркового вещества и площади фильтрационного аппарата, а также снижение площади проксимальных канальцев подтверждает нарушение их реабсорбционной способности, что является ключевым проявлением диабетической нефропатии [46]. На фоне введения ПМК у крыс третьей группы (Ал+Пб) наблюдается частичное восстановление гистоархитектоники почечной ткани. Улучшение морфометрических показателей свидетельствует об умеренном нефропротекторном эффекте пробиотиков. Это согласуется с результатами исследований, в которых описывается положительное влияние

пробиотических штаммов на почечную функцию, связанное с уменьшением воспаления, снижением системной эндотоксикемии и улучшением барьерной функции кишечника [72, 69].

Таким образом, результаты настоящего исследования показывают, что введение ПМК оказывает частичный нефропротекторный эффект, проявляющийся в улучшении морфологических показателей почек.

3.5. Морфометрические показатели кишечника крыс с аллоксан-индуцированным диабетом при введении пробиотического микробного консорциума

При анализе морфометрических данных кишечника, показано, что они у животных первой контрольной группы (К) находились в пределах нормативных значений (таблица 3.5; рисунок 3.8) [15].

Таблица 3.5 – Морфометрические показатели кишечника крыс в контроле (К), с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) при введении пробиотического микробного консорциума (Ал+ПБ)

Показатели	Экспериментальная группа		
	К (1)	Ал (2)	Ал+ПБ (3)
Толщина слизистой, мкм	749,43 (673,51; 832,18)	622,69 (538,18; 740) $p_{1,2}<0,0004$	873,64 (728,87; 991,85) $p_{1,3}<0,02$ $p_{2,3}<0,0001$
Длина ворсинок, мкм	529,37 (484,98; 599,33)	426,14 (370,86; 516,95) $p_{1,2}<0,0002$	662,88 (541,04; 795,99) $p_{1,3}<0,0015$ $p_{2,3}<0,0001$
Ширина ворсинки, мкм	81,04 (71,23; 93,94)	90,04 (76,77; 98,76)	85,22 (70,27; 98,65)
Высота стромы эпителия ворсинок, мкм	69,64 (59,36; 79,43)	66,12 (54,58; 85,44)	61,25 (51,91; 93,71)
Толщина эпителиоцитов, мкм	29,77 (26,79; 34,21)	25,45 (22,01; 29,36) $p_{1,2}<0,0009$	31,37 (27,64; 35,81) $p_{2,3}<0,0001$

Примечание: Указаны медианы и нижнего и верхнего квартилей (Me (Q25:Q75)). $p<0,05$ – достоверность различий в сравнении со значениями контрольной группы животных по критерию Данна.

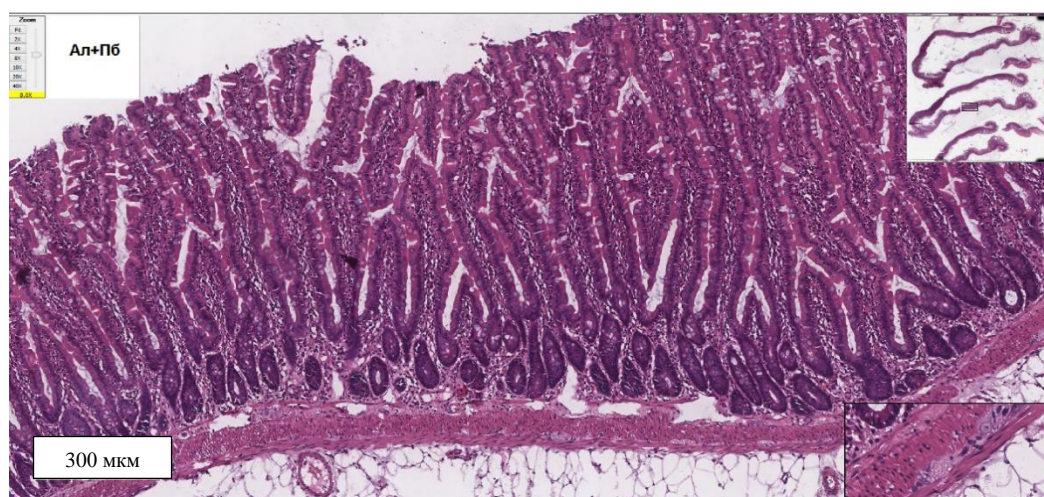
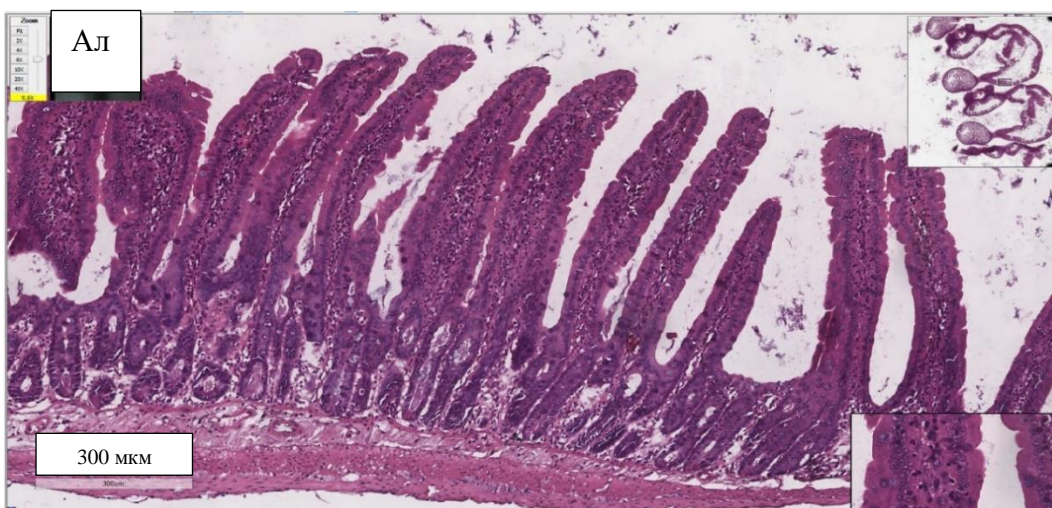
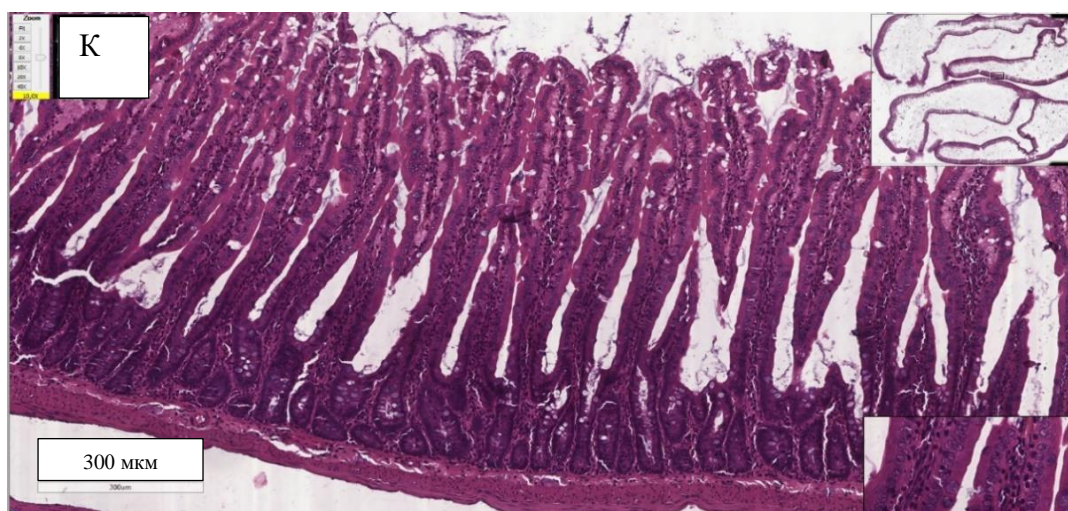


Рисунок 3.8 – Гистологические срезы кишечника крыс в контроле (К), с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) при введении пробиотического микробного консорциума (Ал+Пб) (ув. х8)

На гистологическом срезе тонкой кишки крыс контрольной группы видна чётко выраженная типичная структура слизистой оболочки, соответствующая физиологической норме (рисунок 3.8).

У крыс второй группы (Ал) в модели аллоксан-индуцированного диабета отмечается укорочение ворсинок, некоторые фрагментированы (рисунок 3.8). Клетки эпителия частично разрушены, встречаются участки оголённой базальной мембраны. Бокаловидные клетки представлены в меньшем количестве, что указывает на снижение мукоидной секреции. Подслизистая оболочка умеренно отёчна, с выраженной сосудистой реакцией. Наблюдаются признаки воспалительной инфильтрации. Данная картина свидетельствует о развитии воспалительного процесса и дистрофических изменений в кишечнике. Среди морфометрических изменений отмечается уменьшение толщины слизистой кишечника (на 16,91%; $p < 0,0004$), длины ворсинок (на 19,50%; $p < 0,0002$), толщины эпителиоцитов (на 14,49%; $p < 0,0009$), высоты стромы эпителия ворсинок (на 5,04%), а также незначительное увеличение ширины ворсинок в сравнении с соответствующими показателями у крыс в контроле (таблица 3.5; рисунок 3.8). Это свидетельствует о том, что введение аллоксана привело к разрушению структуры кишечника, истончению слизистой оболочки, повреждению клеток эпителия. Деструкция бокаловидных клеток снижает уровень муцина, что делает слизистую уязвимой к повреждениям [89].

У животных третьей группы (Ал+Пб) на препаратах кишечника ворсинки более удлинённые и структурно приближены к контролю, наблюдается сохранение архитектоники (рисунок 3.8). Эпителий более целостен. Количество бокаловидных клеток увеличено по сравнению с группой Ал, секреция слизи восстановлена. Подслизистая оболочка уплотнена, отёк выражен слабо. Воспалительная инфильтрация минимальна, структура мышечной оболочки сохранена. Выраженность деструктивных и воспалительных процессов снижена по сравнению с группой Ал.

Анализ морфометрических показателей кишечника крыс третьей группы показал, что толщина слизистой кишечника увеличилась на 40,30% ($p < 0,0001$) относительно значений второй группы и на 16,57% ($p < 0,02$) относительно контроля (таблица 3.5; рисунок 3.8). Длина ворсинок увеличилась на 55,55% ($p < 0,0001$) относительно группы Ал и на 25,22% ($p < 0,001$) относительно контроля. Высота стромы эпителия ворсинок уменьшилась в среднем на 12,04% относительно контроля. Следовательно, применение ПМК способствовало увеличению толщины слизистой, что указывает на его защитное действие, о положительном влиянии на восстановление клеток, а также противовоспалительном эффекте.

Таким образом, введение ПМК вызвало выраженное улучшение морфологии кишечника. Согласно литературным данным, пробиотики (*Lactobacillus* и *Enterococcus*) улучшают барьерную функцию кишечника за счёт стимуляции пролиферации эпителиоцитов и регенерации ворсинок через продукцию КЦЖК [67].

Полученные данные свидетельствуют, что введение ПМК на фоне аллоксан-индуцированного диабета оказывает выраженное не прямое регенеративное и противовоспалительное действие на слизистую кишечника. Улучшение морфометрических показателей указывает на потенциальный защитный и регенеративный эффект ПМК в условиях аллоксанового диабета, что делает их перспективным компонентом комплексной терапии диабетической энтеропатии.

Проведённое исследование продемонстрировало выраженные этологические, морфофункциональные и биохимические нарушения у крыс с аллоксан-индуцированным СД, проявляющиеся в повышении индекса тревожности, поражениях печени, почек, кишечника и метаболических показателей крови. Эти изменения включают гипергликемию, выраженную воспалительную реакцию, снижение белкового и энергетического обмена, структурные разрушения в тканях внутренних органов.

Введение 21-суточного курса ПМК у крыс оказало положительное влияние на течение аллоксан-индуцированной патологии. У животных третьей группы наблюдались умеренное снижение уровня глюкозы и СРБ, что свидетельствует о гипогликемическом и противовоспалительном эффекте; частичное восстановление показателей белкового, азотистого и липидного обмена, а также печёночной и почечной функции; улучшение морфометрических характеристик кишечника; восстановление структурных показателей почек; уменьшение степени печеночной дистрофии.

Таким образом, ПМК проявил комплексное защитное действие, включая гепатопротекторный, нефропротекторный, противовоспалительный и антигипергликемический эффекты, что подтверждает перспективность его применения в составе вспомогательной терапии сахарного диабета. Однако сохраняющиеся отклонения от контрольных значений в ряде параметров указывают на необходимость дальнейших исследований механизмов действия пробиотических консорциумов в условиях метаболических нарушений.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено комплексное положительное влияние пробиотического микробного консорциума (ПМК) на уровень тревожности, биохимические и гистологические показатели внутренних органов (кишечника, печени, почек) у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом, включая противовоспалительный, гепатопротекторный и нефропротекторный эффекты.

2. У крыс с аллоксан-индуцированным диабетом выявлено повышение уровня тревожности на протяжении всего эксперимента по сравнению с данными контрольной группы. На первые и седьмые сутки отмечено наибольшее увеличение индекса тревожности на 35,6 % ($p < 0,001$) и 38,0 % ($p < 0,001$) соответственно относительно значений показателей крыс контрольной группы.

3. Введение крысам с аллоксан-индуцированным диабетом пробиотического микробного консорциума вызвало увеличение индекса тревожности на первые и 14-е сутки эксперимента на 27,3 % ($p < 0,05$) и 20,5 % ($p < 0,01$) соответственно относительно контрольных значений.

4. Введение ПМК в модели аллоксан-индуцированного диабета у крыс привело к снижению уровня глюкозы в крови на 20,96% ($p < 0,05$), С-реактивного белка – на 30,92% ($p < 0,05$) по сравнению с данными у животных второй группы с аллоксаном диабетом. Показатели белкового и азотистого обмен частично нормализовались, что подтверждает восстановление метаболических функций печени и почек. Снижение активности печёночных ферментов относительно данных у крыс во второй группе указывает на гепатопротекторное действие ПМК.

5. Введение ПМК в модели аллоксан-индуцированного диабета у крыс способствовало восстановлению гистоархитектоники почек. Площадь клубочка с капсулой увеличилась на 47,25% ($p < 0,001$) по сравнению с

данными у крыс во второй группе. Восстановление площади и диаметра проксимальных и дистальных извитых канальцев подтверждает улучшение реабсорбционной способности нефронов.

6. Введение ПМК в модели аллоксан-индуцированного диабета у крыс способствовало увеличению площади гепатоцитов на 11,53 % ($p < 0,05$) и количество синусоидов снизилось на 26,67% ($p < 0,03$) относительно данных у животных во второй группе, что указывает на частичное восстановление архитектоники печени и нормализацию микроциркуляции.

7. Введение ПМК в модели аллоксан-индуцированного диабета у крыс способствовало увеличению толщины слизистой оболочки кишечника на 40,30% ($p < 0,001$) и длины ворсинок на 55,5% ($p < 0,001$) по сравнению со значениями у животных второй группе, воспалительная инфильтрация и деструктивные изменения в эпителии значительно уменьшились, что подтверждает противовоспалительный и регенеративный эффект ПМК.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов // Москва : Издательство «Медицина». – 1990. – 384 с.
2. Аметов А.С. Инсулинорезистентность и липотоксичность – две грани одной проблемы при сахарном диабете типа 2 и ожирении / А.С. Аметов, Е.А. Тертычная // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2019. – Т. 8. – № 2. – С. 25-33. doi: 10.24411/2304-9529-2019-12003.
3. Аметов А.С. Нарушения в системе гемостаза при сахарном диабете и пути их коррекции при назначении комбинированной терапии Диабетоном МВ и метформином / А.С. Аметов, О.Л. Соловьева // Сахарный диабет. – 2007. – Т. 10. – № 3. – С. 33-39. doi: 10.14341/2072-0351-5995.
4. Аметов А.С. Нарушения липидного обмена при сахарном диабете 2–го типа и их коррекция / А.С. Аметов, Е.В. Сокарева // РМЖ. – 2009. – Т. 24. – С. 15-86.
5. Балаболкин М.И. Функциональная активность тромбоцитов у больных инсулинзависимым сахарным диабетом / М.И. Балаболкин, А.А. Кубатиев, И.А. Рудько, Е.Н. Голега, Г.Н. Сушкевич // Проблемы Эндокринологии. – 1995. – Т. 41. – № 1. С. 6-9. doi: 10.14341/probl11323.
6. Буеверов А.О. Поражение печени при сахарном диабете 1-го типа / А.О. Буеверов, А.В. Зилов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2021. – Т. 31.– № 2. – С. 7-13. doi: 10.22416/1382-4376-2021-31-2-7-13.
7. Геллер Л.И. Лечение жирового гепатоза у больных сахарным диабетом / Л.И. Геллер, Л.Н. Гладких, М.В. Грязнова // Проблемы Эндокринологии. – 1993. – Т. 39. – № 5. – С. 20-22. doi: 10.14341/probl11935.
8. Данилова И. Г. Способ моделирования аллоксанового диабета / И. Г. Данилова, И. Ф. Гетте: Патент на изобретение № 2534411; заявл. 27.11.2014; опубл. 27.11.2014. – Бюл. № 33.

9. Дедов И.И. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова // Сахарный диабет. – 2019. – Вып. 9, № 22(1S1). – С. 1-144. doi:10.14341/DM221S1.
10. Дедов И.И. Распространенность сахарного диабета 2 типа у взрослого населения России (исследование NATION) / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, Г.Р. Галстян // Сахарный диабет. – 2016. – Т. 19. – № 2. – С. 104-112.
11. Дедов И.И. Сахарный диабет / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, А.Ю. Майоров, М.Ш. Шамхалова // Сахарный диабет. – 2020. – Т. 23. – С. 42-114. doi: 10.14341/DM12505.
12. Демидова Т.Ю. Абнормальная кишечная микробиота и нарушение инкретинового эффекта как причины развития сахарного диабета 2 типа / Т.Ю. Демидова, К.Г. Лобанова, Т.Н. Короткова, Л.Д. Харчилава // Медицинский вестник Юга России. – 2022. – Т. 13. – № 1. – С. 24-42. doi: 10.21886/2219-8075-2022-13-1-24-42.
13. Демидова Т.Ю. Влияние кишечной микробиоты на развитие инсулинорезистентности / Т.Ю. Демидова, К.Г. Лобанова, Н.С. Шевцова, Т.Н. Короткова, А.С. Кочина // Медицинский Совет. – 2022. – Т. 10. – С. 84-95. doi: 10.21518/2079-701X-2022-16-10-84-95.
14. Джанашия П.Х. Современный взгляд на проблему диабетической кардиомиопатии / П.Х. Джанашия, П.А. Могутова, Н.Г. Потешкина // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2010. – Т. 9. – № 2. – С. 108-114.
15. Джелдубаева Э.Р. Морфометрические показатели кишечника у крыс при введении пробиотика в модели дисбиоза / Э.Р. Джелдубаева, Н.С. Ярмолюк, В.С. Ржевская, К.Н. Туманянц, Л.Э. Назырова, Д.А. Борисенко // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. – 2024. – Т. 10. – № 4. – С. 65-77.

- 16.Ивашкин В.Т. Психобиотические эффекты пробиотиков и пребиотиков / В.Т. Ивашкин, К.В. Ивашкин // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2018. – Т. 28. – № 1. – С. 4–12. doi:10.22416/1382-4376-2018-28-1-4-12.
- 17.Киселев И.В. Морфологические изменения в почках при диабетической нефропатии у экспериментальных животных / И.В. Киселев, Е.И. Черкасова, И.А. Жукова // Морфология. – 2016. – Т. 149. – № 4. – С. 73–77.
- 18.Корниенко Е.А. Пробиотики, постбиотики и парапробиотики // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – Т. 205. – № 9. – С. 240-250. doi: 10.31146/1682-8658-есд-205-9-240-250.
- 19.Кураева Т.Л. Распространенность факторов социального риска у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа (СД1) в России, их связь с недостаточным метаболическим контролем / Т.Л. Кураева, А.В. Карпушкина, Е.А. Андрианова [и др.] // Сахарный диабет. – 2024. – Т. 27. – № 5. – С. 401-410. doi: 10.14341/DM12939.
- 20.Лавриненко В.А. Выделительная функция почек // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т.7. – № 11. – С. 13-18.
- 21.Литвицкий П.Ф. Расстройства липидного обмена // Вопросы современной педиатрии. – 2012. – Т. 11 – № 6. – С. 48-62. doi: 10.15690/vsp.v11i6.492.
- 22.Луценко Т.М. Морфофункциональное состояние печени крыс при экспериментальном сахарном диабете / Т.М. Луценко, И.И. Кобзарь, А.Ю. Лозовская // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2020. – № 4. – С. 102–108.
- 23.Макаров В.Г. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / под ред. В.Г. Макарова, М.Н. Макаровой // СПб. : Изд-во «ЛЕМА». – 2013. – 116 с.
- 24.Макарова В.Г. Клиническая биохимия: учеб. пособие. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 416 с.

- 25.Мальшев М.Е. Влияние пробиотиков на состояние секреторного иммунитета слюны у больных сахарным диабетом 2-го типа / М.Е. Мальшев, А.К. Иорданишвили, О.В. Присяжнюк, А.О. Бумай // Стоматология. – 2019. – Т. 98. – № 6. – С. 26-29. doi: 10.17116/stomat20199806126.
- 26.Миронов А.К. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.К. Миронов. – Москва : Издательство «Гриф и К». – 2012. — 944 с.
- 27.Мустафина Л. Р. Частный курс гистологии: учебное пособие: в 2 частях / Л. Р. Мустафина, А. В. Герасимов, А. В. Потапов [и др.] / Томск: СибГМУ. – 2022. – С. 169.
- 28.Парфенов А.И. Значение повышенной проницаемости кишечника в патогенезе внутренних болезней // Терапевтический архив. – 2024. – Т. 96. – № 2. – С. 85–90. doi: 10.26442/00403660.2024.02.202587.
- 29.Паштаев Н.П. Влияние краткосрочной заместительной инсулинотерапии на концентрацию VEGF-A фактора во внутриглазной жидкости при аллоксановой модели сахарного диабета у крыс / Н.П. Паштаев, Н.А. Поздеева, И.В. Мадянов [и др.] // Вестник ВолгГМУ. – 2018. – Вып. 4 (68). – С. 25-27. doi 10.19163/1994-9480-2018-4(68)-25-27.
- 30.Рагимов М.Р. Структурные особенности поджелудочной железы у пациентов с сахарным диабетом 1 типа / М.Р. Рагимов, Т.В. Никонова, Д.М. Бабаева, В.П. Владимирова, М.В. Шестакова // Сахарный диабет. – 2022. – Т. 25. – № 3. – С. 239-248. doi: 10.14341/DM12892.
- 31.Савельева С.А. Особенности поражения почек у больной сахарным диабетом 2 типа / С.А. Савельева, Н.Л. Козловская, И.Н. Бобкова, В.А. Варшавский, Е.П. Голицына // Сахарный диабет. – 2009. – Т. 12. – № 4. – С. 114-116. doi: 10.14341/2072-0351-5717.
- 32.Сваровская А.В. Сахарный диабет 2 типа и сердечная недостаточность — современный взгляд на механизмы развития / А.В. Сваровская, А.А.

- Гарганеева // Сахарный диабет. – 2022. – Т. 25. – № 3. – С. 267-274. doi: 10.14341/DM12648.
33. Соболев В. Е. Крыса (*Rattus norvegicus*) как объект исследования в модели острого отравления фосфорорганическими соединениями. Многофункциональные изменения почек / В. Е. Соболев, Е. А. Корф, Н. В. Гончаров // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2019. – Т. 55. – № 4. – С. 272-281. doi: 10.1134/S0044452919040119.
34. Стрюк Р.И. С-реактивный белок как показатель риска сердечно-сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом 2-го типа и его коррекция / Р.И. Стрюк, М.И. Свиридова, А.М. Мкртумян, А.А. Голикова // Клин. мед. – 2016. – Т. 94. – № 9. – С. 683—687. doi: 10.18821/0023-2149-2016094-9-683-687.
35. Телесманич Н.Р. Молекулярно- метаболические механизмы сахарного диабета 1 и 2 типа, лабораторная диагностика / Н.Р. Телесманич, З.И. Микашинович М.А. Коновальчик // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – Т. 203. – № 7. – С. 177–184. doi: 10.31146/1682-8658-esg-203-7-177-184.
36. Фурманова О.В. Лейкоцитарный состав и индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов в крови у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2-го типа в зависимости от величины избыточной / О.В. Фурманова, К.П. Зак, В.В. Попова, Н.Д. Тронько // Международный журнал эндокринологии. – 2020. – Т. 16. – № 7. – С. 526-533. doi: 10.22141/2224-0721.16.7.2020.219006.
37. Хайруллин Д. Д. Гистологическая характеристика почек белых крыс на фоне применения УВМК «Лизунец» / Д.Д. Хайруллин, Е.Г. Губеева, Ш.К. Шакиров, А.Р. Кашаева, А.В. Маланьев, Р.М. Потехина // Ученые записки КГАВМ имени Н.Э. Баумана – 2020. – Т. 244. – № 4. - С. 216-220. doi: 10.31588/2413-4201-1883-244-4-216-220.

38. Ченцов Д.В. Характеристика поражений пищеварительной системы у пациентов с сахарным диабетом / Д.В. Ченцов, Ю.В. Коковина, Б.И. Асланов, Т.М. Чиркина, А.В. Тиселько // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – Т. 11. – С. 216-226. doi: 10.31146/1682-8658-esg-207-11-216-226.
39. Черданцева Т.М. Морфология общепатологических процессов: учебно-методическое пособие / Т.М. Черданцева, Г.П. Казанцева // ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань: ОТСиОП. – 2020. – С. 68.
40. Шестакова М.В. Сахарный диабет и хроническая болезнь почек: возможности прогнозирования, ранней диагностики и нефропротекции в XXI веке / М.В. Шестакова // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 6. – С. 84-88. doi:10.17116/terarkh201688684-88.
41. Шимановская Н.Л. Гистологические изменения печени при диабетической гепатопатии у крыс / Н.Л. Шимановская, Е.Ю. Тарасова, Е.В. Козловская // Морфология. – 2019. – Т. 156. – № 2. – С. 59–64.
42. Юсупова Д.Г. Особенности клинической диагностики эмоциональных и когнитивных нарушений у пациентов с сахарным диабетом / Д.Г. Юсупова, Н.А. Супонева // Эффективная фармакотерапия. – 2023. – Т. 19. – № 3. – С. 36-40. doi: 10.33978/2307-3586-2023-19-3-36-40.
43. Adane T. White blood cells and platelet profiles of diabetic patients at University of Gondar specialized referral hospital: A comparative cross-sectional study / T. Adane, F. Asrie, Z. Getaneh, S. Getawa // J Clin Lab Anal. – 2021. – Vol. 35, № 6. – P. 3808. doi: 10.1002/jcla.23808.
44. Adnan A. Correlation of Blood Urea and Creatinine Levels With Thiamin Levels in Type 1 and Type 2 Diabetic Patients / A. Adnan, F. Fizza, E. Wajeeha [et al.] // Cureus. – 2024. – Vol. 16, № 3. P. 57022. doi: 10.7759/cureus.57022.
45. Al-Hashem F.H. Hepatoprotective effect of camel milk against alloxan-induced diabetes in rats / F.H. Al-Hashem, M. Dallak, N. Bashir, R.A. Eid // Int. J. Mol. Cell. Med. – 2017. – Vol. 6, № 2. – P. 108–115.

46. Alicic R.Z. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities / R.Z. Alicic, M.T. Rooney, K.R. Tuttle // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2017. – Vol. 12, № 12. – P. 2032–2045. doi:10.2215/CJN.11491116.
47. Andrade-Oliveira V. Adipokines as drug targets in diabetes and underlying disturbances / V. Andrade-Oliveira, N.O.S. Câmara, P.M. Moraes-Vieira // *J. Diabetes Res.* – 2015. – Vol. 2015. – doi: 10.1155/2015/681612.
48. Baghel K. Role of Synbiotics (Prebiotics and Probiotics) as Dietary Supplements in Type 2 Diabetes Mellitus Induced Health Complications / K. Baghel, A. Khan, N. Kango // *J Diet Suppl.* – 2024. – Vol. 21, № 5. – P. 677-708. doi: 10.1080/19390211.2024.2340509.
49. Bajaj J.S. Modulation of the Metagenome by Probiotics in Cirrhosis: A Randomized Controlled Trial / J.S. Bajaj, D.M. Heuman, A.J. Sanyal [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 109, №. 11. – P. 1906–1915. doi:10.1038/ajg.2014.253.
50. Bajinka O. The predicted mechanisms and evidence of probiotics on type 2 diabetes mellitus (T2DM) / O. Bajinka, K. Sylvain Dovi, L. Simbilyabo [et al.] // *Arch Physiol Biochem.* – 2024. – Vol. 130, № 4. – P. 475-490. doi: 10.1080/13813455.2022.2163260.
51. Baroni I. Probiotics and synbiotics for glycemic control in diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / I. Baroni, D. Fabrizi, M. Luciani [et al.] // *Clin Nutr.* – 2024. – Vol. 43, № 4. – P. 1041-1061. doi: 10.1016/j.clnu.2024.03.006.
52. Birnmatsy K. Platelet functional activity in patients with insulin-dependent diabetes mellitus / K. Birnmatsy, I.I. Nozaki, S. Arimori // *Diabetologia.* – 1987. – Vol. 30. – P. 310-313.
53. Chandrasekharan B. Diabetes and the intestinal barrier: Altered gut permeability and tight junction dysfunction in type 1 and type 2 diabetes / B. Chandrasekharan, S. Srinivasan // *Gastroenterology.* – 2022. – Vol. 162, № 1. – P. 194–209. – doi: 10.1053/j.gastro.2021.08.039.

54. Derrien M. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota / M. Derrien, J.E.T. van Hylckama Vlieg // *Trends in Microbiology*. – 2015. – Vol. 23, № 6. – P. 354–366. – doi: 10.1016/j.tim.2015.03.002.
55. Everard A. Gut microbiota and GLP-1 / A. Everard, P.D. Cani // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* – 2014. – Vol. 15. – P. 189-196. doi: 10.1007/s11154-013-9271-3.
56. Gati M. A. Physiological and histological study of experimental diabetes mellitus by alloxan // *Int. J. Adv. Res.* – 2016. – Vol. 4, № 3. – P. 1814-1818.
57. Hagihara M. The impact of gut microbiota on metabolic disorders and immune-related diseases / M. Hagihara, R. Yamashita, A. Matsumoto [et al.] // *Intern. Med.* – 2019. – Vol. 58, № 23. – P. 3175–3182. doi: 10.2169/internalmedicine.2842-19.
58. Hasanian-Langroudi F. Novel Insight into the Effect of Probiotics in the Regulation of the Most Important Pathways Involved in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus / F. Hasanian-Langroudi, A. Ghasemi, M. Hedayati [et al.] // *Probiotics Antimicrob Proteins.* – 2024. – Vol. 16, № 3. – P. 829-844. doi: 10.1007/s12602-023-10056-8.
59. Henning RJ. Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease // *Future Cardiol.* – 2018. – Vol. 14, № 6. – P. 491-509. doi: 10.2217/fca-2018-0045.
60. Heshmati J. Probiotics and inflammation in diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis // *Nutrition Reviews.* – 2019. – Vol. 77, № 8. – P. 521–534. doi: 10.1093/nutrit/nuz018.
61. Ho J.E. Is diabetes mellitus a cardiovascular disease risk equivalent for fatal stroke in women? Data from the Women’s Pooling Project / J.E. Ho, F. Paultre, L. Mosca // *Stroke.* – 2003. – Vol. 34. – P. 2812—2816.
62. Kamada N. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease / N. Kamada, S.U. Seo, G.Y. Chen, G. Núñez // *Nature Reviews Immunology.* – 2013. – Vol. 13, № 5. – P. 321–335. – doi: 10.1038/nri3430.

63. Karam R. Lactate Dehydrogenase can be Considered a Predictive Marker of Severity and Mortality of Covid-19 in Diabetic and Non-Diabetic Patients / R. Karam, V. Joseph, E. Nesreen // *American Heart Journal*. – 2022. – Vol. 254. – P. 246–247. doi: 10.1016/j.ahj.2022.10.040.
64. Kobyliak N. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view / N. Kobyliak, C. Conte, G. Cammarota [et al.] // *Nutr. Metab. (Lond)*. – 2016. – Vol. 13. doi:10.1186/s12986-016-0067-0.
65. Kobyliak N. Probiotics for pancreatic beta-cell function: from possible mechanism of action to assessment of effectiveness / N. Kobyliak, M. Khomenko, T. Falalyeyeva [et al.] // *Crit Rev Microbiol*. – 2024. – Vol. 50, № 5. – P. 663–683. doi: 10.1080/1040841X.2023.2257776.
66. Li X. Probiotics intervention for type 2 diabetes mellitus therapy: a review from proposed mechanisms to future prospects / X. Li, Y. Xia, X. Song [et al.] // *Crit Rev Food Sci Nutr*. – 2024. – Vol. 8. – P. 1–19. doi: 10.1080/10408398.2024.2387765.
67. Louis P., Flint H.J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota // *Environmental Microbiology*. – 2017. – Vol. 19, № 1. – P. 29–41. – doi: 10.1111/1462-2920.13589.
68. Min'an Z. Immunological mechanisms of inflammatory diseases caused by gut microbiota dysbiosis: A review / Z. Min'an hao, C. Jiayi, F. Shiyao [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2023. – Vol. 164. – P. 114985. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114985.
69. Miraghajani M. The role of probiotics in chronic kidney disease: a review of current evidence / M. Miraghajani, N. Zaghian, P. Dehghan [et al.] // *J. Ren. Nutr*. – 2021. – Vol. 31, № 5. – P. 488–497. doi:10.1053/j.jrn.2020.10.008.
70. Moravejolahkami AR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics in type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of clinical trials / AR. Moravejolahkami, M. Shakibaei, AM. Fairley, M. Sharma // *Diabetes Metab Res Rev*. – 2024. – Vol. 40, № 2. – P. 3655. doi: 10.1002/dmrr.3655.

71. Qu Q. The Intervention of Probiotics on Type 2 Diabetes Mellitus in Animal Models / Q. Qu, P. He, Y. Zhang, S. Yang, P. Zeng // *Mol Nutr Food Res.* – 2024. – Vol. 68, № 1. – P. 2200815. doi: 10.1002/mnfr.202200815.
72. Ranganathan N. Probiotic dietary supplementation in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease: a 6-month pilot scale trial / N. Ranganathan, E.A. Friedman, P. Tam [et al.] // *Nutrients.* – 2017. – Vol. 9, № 6. – Article ID 439. doi:10.3390/nu9060439.
73. Salgaço M.K. Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes mellitus / L.G.S. Oliveira, G.N. Costa, F. Bianchi, K. Sivieri // *Microbiol Biotechnol.* – 2019. – Vol. 103, № 23-24. – P. 9229-9238. doi: 10.1007/s00253-019-10156-y.
74. Sarmadi R. The role of probiotics on microvascular complications of type-2 diabetes: Nephropathy and retinopathy / R. Sarmadi, H. Lotfi, F. Ghiasi [et al.] // *J Cardiovasc Thorac Res.* – 2024. – Vol. 16, № 2. – P. 65-76. doi: 10.34172/jcvtr.32877.
75. Shen X. Probiotics: A potential strategy for improving diabetes mellitus complicated with cognitive impairment / X. Shen, F. Zhao, Z. Zhao, J. Yu, Z. Sun // *Microbiol Res.* – 2024. – Vol. 290. – P. 127960. doi: 10.1016/j.micres.2024.127960.
76. Shen X. The Role and Mechanism of Probiotics Supplementation in Blood Glucose Regulation: A Review / X. Shen, C. Ma, Y. Yang [et al.] // *Foods.* – 2024. – Vol. 13, № 17. – P. 2719. doi: 10.3390/foods13172719.
77. Song H. Amelioration of Type 2 Diabetes Using Four Strains of Lactobacillus Probiotics: Effects on Gut Microbiota Reconstitution-Mediated Regulation of Glucose Homeostasis, Inflammation, and Oxidative Stress in Mice / H. Song, H. Xue, Z. Zhang [et al.] // *J Agric Food Chem.* – 2023. – Vol. 71, № 51. – P. 20801-20814. doi: 10.1021/acs.jafc.3c04665.
78. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β -cells of the rat pancreas // *Physiological Research.* – 2001. – Vol. 50, № 6. – P. 537–546.

79. Tang W.H. Gut microbiota in cardiovascular health and disease / W.H. Tang, T. Kitai, S.L. Hazen // *Circulation Research*. – 2017. – Vol. 120, № 7. – P. 1183–1196. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309715.
80. Tao YW. Effects of probiotics on type II diabetes mellitus: a meta-analysis / YW. Tao, YL. Gu, XQ. Mao [et al.] // *J Transl Med*. – 2020. – Vol. 18, № 1. – P. 30. doi: 10.1186/s12967-020-02213-2.
81. Tarantino G. Hype or reality: should patients with metabolic syndrome-related NAFLD be treated with probiotics? / G. Tarantino, V. Citro, C. Finelli // *J. Transl. Med.* — 2019. — Vol. 17. — P. 25. doi: 10.1186/s12967-019-1771-5.
82. Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging driving force in chronic kidney disease / G. Targher, C.D. Byrne // *Nat. Rev. Nephrol.* — 2017. — Vol. 13. — P. 297–310. doi: 10.1038/nrneph.2017.30.
83. Tonucci L.B. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study / L.B. Tonucci, K.M. Olbrich Dos Santos, L. Licursi de Oliveira [et al.] // *Clin Nutr.* – 2015. – doi: S0261-5614(15)00331-3.
84. Vallianou N.G. Microbiome and diabetes: Where are we now? / N.G. Vallianou, T. Stratigou, S. Tsagarakis // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2020. – Vol. 162. – P. 108061. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108061.
85. Van Syoc EP. The Effects of Bifidobacterium Probiotic Supplementation on Blood Glucose: A Systematic Review and Meta-Analysis of Animal Models and Clinical Evidence / EP. Van Syoc, J. Damani, Z. DiMattia [et al.] // *Adv Nutr.* – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 100137. doi: 10.1016/j.advnut.2023.10.009.
86. Watanabe J. Enhancement of platelet aggregation by low-density lipoproteins from IDDM patients / J. Watanabe, H. J. Wohitmann, R. L. Klein [et al.] // *Diabetes* – 1988. – Vol. 37. – P. 1652.
87. World Health Organization. Global report on diabetes // Retrieved from WHO. – P. 65-81.

88. Wu H. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug / H. Wu, E. Esteve, V. Tremaroli [et al.] // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 23. – P. 850–858. – doi: 10.1038/nm.4345.
89. Wu H. The role of inflammation and oxidative stress in diabetic kidney disease: updated mechanisms and therapeutic strategies / H. Wu, L. Kong, Y. Cheng [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2020. – Vol. 131. – Article ID 110693. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110693.
90. Yadav H. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats / H. Yadav, S. Jain, P.R. Sinha // *Nutrition*. — 2007. — Vol. 23, № 1. — P. 62–68. doi: 10.1016/j.nut.2006.09.002.
91. Zhang D. Chronic hyperglycemia promotes hepatic microvascular injury in diabetes via oxidative stress and inflammation / D. Zhang, X. Wang, Y. Lu, Y. Ji // *Biomed. Pharmacother.* – 2014. – Vol. 68, № 8. – P. 1035–1042. doi: 10.1016/j.biopha.2014.10.004.