

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Биология. Химия. Том 11 (77). 2025. № 3. С. 264–272.

УДК 591.5:579.222+57.084

DOI 10.29039/2413-1725-2025-11-3-264-272

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕЧЕНИ КРЫС
С АЛЛОКСАН-ИНДУЦИРОВАННЫМ ДИАБЕТОМ ПРИ ВВЕДЕНИИ
ПРОБИОТИЧЕСКОГО МИКРОБНОГО КОНСОРЦИУМА**

Ярмолюк Н. С., Джелдубаева Э. Р., Ржевская В. С., Туманянц К. Н.,

Аединова Д. З., Ковальчук И. О.

**ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь,
Республика Крым, Россия
E-mail: nat_yarm@mail.ru**

У крыс с аллоксановым диабетом наблюдаются выраженные дистрофические изменения печени. Введение курса пробиотического микробного консорциума 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.

Ключевые слова: аллоксан, пробиотический микробный консорциум, крысы, печень.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие рост заболеваемости сахарным диабетом (СД) подчёркивает необходимость поиска новых подходов, направленных не только на нормализацию гликемии, но и на защиту органов-мишеней, особенно печени. Эндокринные нарушения и хроническая гипергликемия при СД приводят к значительному оксидативному стрессу, что запускает каскад реактивных форм кислорода, повреждающих липиды, белки и ДНК гепатоцитов [1]. Вследствие этого в печени наблюдаются выраженные морфологические изменения – жировая дистрофия, некроз, фиброз, а активация воспалительных путей усугубляет структурное нарушение паренхимы [2].

В настоящее время всё больше акцентируется внимание на кишечно-печёночной оси («gut-liver axis»), влиянии микробиоты и пробиотиков на метаболизм, воспаление и защиту тканей печени. Показаны положительные эффекты пробиотиков при метаболических нарушениях, включая снижение липидных и гликемических показателей, ослабление структурных изменений печени при неалкогольной жировой болезни и диабете [3].

Тем не менее, морфометрическая оценка печени крыс с аллоксан-индуцированным диабетом при введении пробиотического микробного консорциума остаётся недостаточно изученной темой.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось выявление изменений гистологических показателей печени после введения курса пробиотического микробного консорциума в модели аллоксан-индуцированного диабета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе Центра 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» в рамках выполнения НИР № АААА-А21-121011990099-6.

Экспериментальные исследования выполнены на 30 половозрелых крысах самцах линии Wistar (масса 300–350 г), содержащихся согласно требованиям ГОСТ 33216-2014 и нормативным рекомендациям по уходу за лабораторными животными. Все манипуляции соответствовали национальному законодательству и положениям Базельской декларации, одобрены локальным комитетом по биоэтике КФУ им. В. И. Вернадского (протокол № 5, 2022 г.).

Животные были разделены на три экспериментальные группы по 10 особей в каждой. Контрольная группа (К) получала интрагастрально 3 мл воды ежедневно в течение 21 суток. Вторая группа с моделированием аллоксан-индуцированного диабета (Ал) получала внутрибрюшинно аллоксана моногидрат (мезоксалиломочевина, «Диаэм», Россия) в дозе 100 мг/кг на протяжении трёх дней, после чего также интрагастрально вводилась вода [4]. Третья группа Ал+ПБ в аналогичных условиях моделирования диабета с 11 дня эксперимента дополнительно получала ПМК интрагастрально в виде 1 %-го раствора объёмом 3 мл ежедневно в течение 21 дня.

Контроль уровня глюкозы крови осуществлялся в ходе эксперимента из капиллярной крови хвоста с использованием глюкометра «iCheck» («Diamedical», Великобритания).

Пробиотический консорциум был синтезирован на кафедре ботаники и физиологии растений из депонированных штаммов, зарегистрированных во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ): *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.

Штаммы культивировали совместно в жидкой питательной среде MRS следующего состава (г/л): ферментативный пептон – 10,0; дрожжевой экстракт – 4,0; твин-80 – 1,0 мл; мясной экстракт – 8,0; глюкоза – 20,0; KH_2PO_4 – 2,0; $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 5,0; $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ – 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; pH – 6,3. Стерилизация среды производилась при 0,75 атм в течение 20 мин.

Культивирование осуществляли в биореакторе Minifors 2 (Infors HT, Швейцария) при температуре 32 °C, аэрации 50 об/мин, в течение 72 часов. Количественный состав определяли методом серийных разведений, итоговая концентрация составила $1,3 \times 10^9$ КОЕ/мл.

На 22-е сутки все животные выводились из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом. Объектом гистологического анализа являлись образцы печени крыс, обработка которых проводилась в ЦКП «Молекулярная биология» Медицинского института им. С. И. Георгиевского.

Морфометрические показатели печени являются важными диагностическими параметрами, позволяющими оценить степень поражения органа при СД. Печень играет ключевую роль в регуляции углеводного, жирового и белкового обмена, поэтому диабетические изменения в ней могут быть значительными.

Морфометрический анализ проводили в программе Aperio Imagescope (v12.4.6.5003) 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. Измеряются данные показатели в 5–10 полях зрения, рассчитывается среднее значение.

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

Статистический анализ данных проводили в GraphPad Prism 8 и MS Excel 2010. Проверка нормальности распределения осуществлялась по критерию Шапиро–Уилка. Сравнение между группами проводили с использованием критерия Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. Уровень статистической значимости установлен на уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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 (рис. 1).

Цитоплазма гепатоцитов окрашивается неравномерно – околоядерное пространство относительно темнее, чем периферия клетки. Синусоиды вытянутые, с четкими границами. Центральная вена крупная, в ней заметны клетки крови. Выделяются эндотелиоциты синусоидов и сосудов, выстилающие сосуды изнутри. Морфометрические показатели печени крыс контрольной группы представлены в табл. 1.

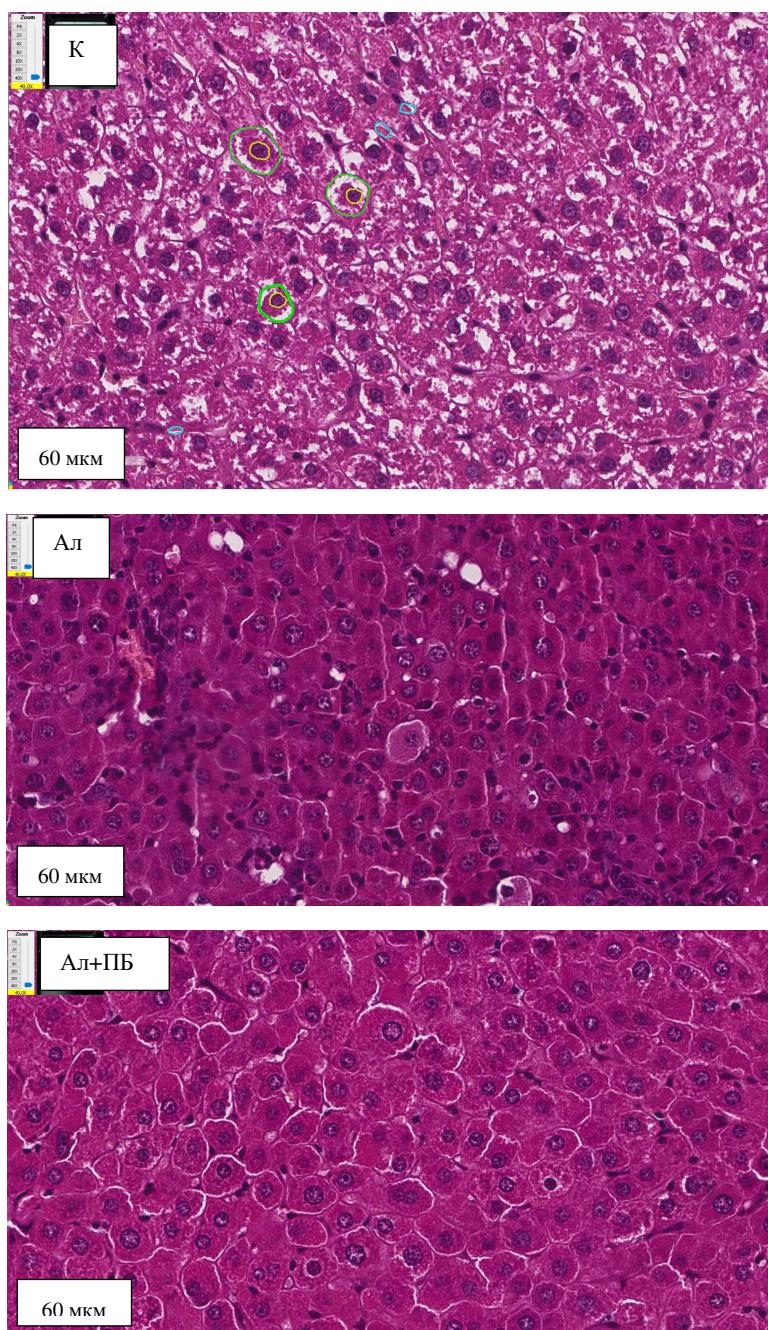


Рис. 1. Гистологические срезы печени крыс в контроле (К), с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) при введении пробиотического микробного консорциума (Ал+ПБ) (ув. х40)

Таблица 1
Морфометрические показатели печени крыс в контроле (К), с аллоксан-индуцированным диабетом (Ал) при введении пробиотического микробного консорциума «Пробиовит» (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.

На гистосрезах печени крыс второй группы (Ал) на фоне аллоксанового диабета отмечается гепатоцитарная дистрофия, клетки увеличены, их форма и границы нарушены (рис. 1). Цитоплазма гепатоцитов вакуолизирована (признаки жировой инфильтрации). Центральные вены и синусоиды расширены, что может свидетельствовать о нарушении микроциркуляции. Присутствуют признаки воспалительной инфильтрации. 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 (табл. 1, рис. 1). 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 со 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 (рис. 2).

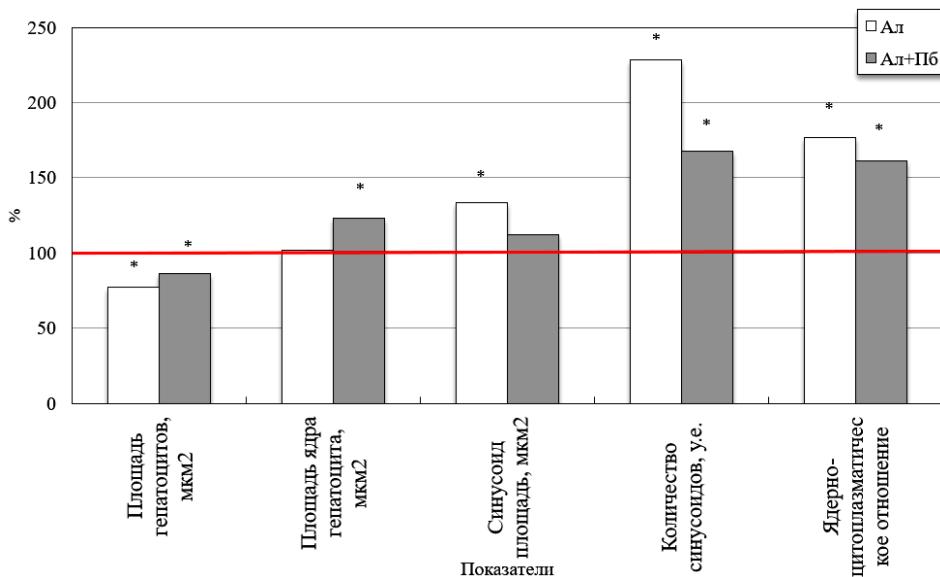


Рис. 2. Изменение морфометрических показателей печени крыс с аллоксан-индукционным диабетом (Ал) и после курса введения пробиотического микробного консорциума (Ал+Пб) (в сравнение с показателями контрольной группой животных, принятых за 100 %, отмечены красной линией).

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

Таким образом, у крыс с аллоксановым диабетом наблюдаются выраженные дистрофические изменения печени. Эти изменения согласуются с результатами исследований, в которых описано гепатологические и микроваскулярных нарушений на фоне гипергликемии и оксидативного стресса при СД [5, 6]. Увеличение площади ядер и ядерно-цитоплазматического отношения связано с компенсаторной гипертрофией ядра и нарушением клеточного гомеостаза, характерным для диабетического поражения печени [7]. Резкое увеличение площади и количества синусоидов указывает на отёчные и воспалительные процессы, нарушающую микроциркуляцию в печеночной ткани, что показано литературе как один из ранних маркеров диабетической гепатопатии [8].

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. Ранее было показано, что пробиотики, в том числе штаммы рода *Lactobacillus* и *Enterococcus*, способны снижать уровень воспаления, улучшать состояние сосудистого эндотелия, восстанавливать барьерную функцию кишечника и снижать системную интоксикацию при метаболических нарушениях [9, 10]. Снижение ядерно-цитоплазматического отношения, несмотря на его сохранение выше контрольных значений, свидетельствует о частичном неполном восстановлении клеточного гомеостаза и уменьшении гипертрофии ядер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Экспериментальная физиология и биофизика» в рамках инициативной темы № АААА-А21-121011990099-б «Физиологические механизмы биологического действия факторов разной природы и интенсивности» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского».

Список литературы

1. Asmat Ullah. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review / Asmat Ullah, Abad Khan, Ismail Khan // Saudi Pharmaceutical Journal – 2016. – Vol. 24, Is. 5. – P. 547–553.
2. Roni Weinberg Sibony. Overview of oxidative stress and inflammation in diabetes / Roni Weinberg Sibony, Omri Segev, Saar Dor, Itamar Raz // Journal of Diabetes. – 2024. – 16. – e70014. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.70014>.
3. Gao Y. Multi-strain probiotics attenuate carbohydrate-lipid metabolic dysregulation in type 2 diabetic rats via gut-liver axis modulation / Y. Gao, Y. Liu, Z. Li [et al.] // mSystems. – 2025. – 10(7). – e00369-25. doi: 10.1128/msystems.00369-25.

4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Луценко Т. М. Морффункциональное 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.

**MORPHOMETRIC INDICATORS OF THE LIVER IN RATS WITH
ALLOKSAN-INDUCED DIABETES WHEN INTRODUCING A PROBIOTIC
MICROBIAL CONSORTIUM**

***Yarmolyuk N. S., Dzheldubaeva E. R., Rzhevskaya V. S., Tumanyants K. N.,
Aedinova D. Z., Kovalchuk I. O.***

***V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia
E-mail: nat_yarm@mail.ru***

In the last decade, the increase in diabetes mellitus highlights the need to find new approaches aimed not only at normalizing glycemia, but also at protecting target organs, especially the liver. Endocrine disorders and chronic hyperglycemia in diabetes mellitus lead to significant oxidative stress, which triggers a cascade of reactive oxygen species that damage the lipids, proteins, and DNA of hepatocytes. As a result, pronounced morphological changes are observed in the liver – fatty degeneration, necrosis, fibrosis, and activation of inflammatory pathways exacerbates the structural disorder of the parenchyma. Currently, more and more attention is being focused on the gut-liver axis, the effect of microbiota and probiotics on metabolism, inflammation and protection of liver tissues. The positive effects of probiotics in metabolic disorders have been shown, including the reduction of lipid and glycemic indicators, the attenuation of structural changes in the liver in non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. Nevertheless, the morphometric assessment of the liver of rats with alloxan-induced diabetes when the probiotic microbial consortium is administered remains an understudied topic. In light of the above, the aim of this study was to identify changes in liver histological parameters after administration of a probiotic microbial consortium in an alloxan-induced diabetes model.

The animals were divided into three experimental groups of 10 animals each. The control group (C) received 3 ml of water intragastrically daily for 21 days. The second

group with modeling of alloxan-induced diabetes (Al) received intraperitoneal alloxan monohydrate (mesoxalilomochevin, Diaem, Russia) at a dose of 100 mg/kg for three days, after which water was also administered intragastrically. The third group, Al+PB, received an additional 1 % intragastric solution of 3 ml daily for 21 days.

Thus, rats with alloxan-induced diabetes exhibit pronounced dystrophic changes in the liver. These changes are consistent with the findings of studies that describe hepatic and microvascular abnormalities in the context of hyperglycemia and oxidative stress in diabetes mellitus. The increase in nuclear area and nuclear-cytoplasmic ratio is associated with compensatory nuclear hypertrophy and cellular homeostasis disruption, which are characteristic of diabetic liver damage. A sharp increase in the area and number of sinusoids indicates edematous and inflammatory processes that disrupt microcirculation in the hepatic tissue, which has been shown in the literature as one of the early markers of diabetic hepatopathy.

The introduction of the PMC course has a partially protective effect, contributing to the preservation of the liver's structural organization and the partial restoration of its cellular composition, but it does not completely prevent the damage caused by alloxan, as evidenced by the continued increase in the nuclear-cytoplasmic ratio and the area of sinusoids.

Keywords: alloxan, probiotic microbial consortium, rats, liver

References

1. Asmat Ullah, Abad Khan, Ismail Khan. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review, *Saudi Pharmaceutical Journal*, **24**, 5, 547 (2016).
2. Roni Weinberg Sibony, Omri Segev, Saar Dor, Itamar Raz. Overview of oxidative stress and inflammation in diabetes, *Journal of Diabetes*, **16**, e70014 (2024) <https://doi.org/10.1111/1753-0407.70014>.
3. Gao Y., Liu Y., Li Z. [et al.] Multi-strain probiotics attenuate carbohydrate-lipid metabolic dysregulation in type 2 diabetic rats via gut-liver axis modulation, *mSystems*, **10**(7), e00369-25 (2025) doi: 10.1128/msystems.00369-25.
4. Danilova I. G., Goette I. F. *Method of modeling alloxan diabetes*, Patent for invention No. 2534411; application No. 27.11.2014; publ. 27.11.2014. – Bul. No. 33.
5. Shimanovskaya N. L., Tarasova E. Y., Kozlovskaya E. V. Histological liver changes in diabetic hepatopathy in rats, *Morphology*, **156**, 2, 59 (2019).
6. Al-Hashem F. H., Dallak M., Bashir N., Eid R. A. Hepatoprotective effect of camel milk against alloxan-induced diabetes in rats, *Int. J. Mol. Cell. Med.*, **6**, 2, 108 (2017).
7. Lutsenko T. M., Kobzar I. I., Lozovskaya A. Yu. Morphofunctional state of the rat liver in experimental diabetes mellitus, *Bulletin of VSU. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, **4**, 102 (2020).
8. Zhang D., Wang X., Lu Y., Ji Y. Chronic hyperglycemia promotes hepatic microvascular injury in diabetes via oxidative stress and inflammation, *Biomed. Pharmacother.*, **68**, 8, 1035 (2014). doi: 10.1016/j.biopharm.2014.10.004.
9. Ivashkin V. T., Ivashkin K. V. Psychobiotic Effects of Probiotics and Prebiotics, *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, **28**, 1, 4 (2018). doi:10.22416/1382-4376-2018-28-1-4-12.
10. Kobyliak N., Conte C., Cammarota G. [et al.] Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view, *Nutr. Metab. (Lond)*, **13** (2016) doi:10.1186/s12986-016-0067-0.