

*На правах рукописи*

**Ачасова Ксения Михайловна**

**РОЛЬ ГЛИКОПРОТЕИНА МУЦИНА2 И ЕГО  
СТРУКТУРНОГО КОМПОНЕНТА ФУКОЗЫ  
В РЕГУЛЯЦИИ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ  
КИШЕЧНИКА**

**03.03.01 – Физиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Новосибирск - 2022**

Работа выполнена в лаборатории генетики лабораторных животных ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (г. Новосибирск).

**Научный руководитель – Екатерина Анатольевна Литвинова**, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник сектора психонейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» (г. Новосибирск).

**Официальные оппоненты:**

**Тимур Яшэрович Вахитов**, д-р биол. наук, главный научный сотрудник группы метаболизма неинфекционных заболеваний ФГБУН «Институт экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург);

**Елена Андреевна Блинова**, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск).

**Ведущая организация – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет».**

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.014.02 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. акад. Тимакова, 4. Адреса для корреспонденции: 630117, г. Новосибирск, а/я 237; тел. (383)335-98-01, факс (383) 335-97-54, эл. почта: dissovet@neuronm.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИНМ и на сайте [www.neuronm.ru](http://www.neuronm.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
д-р биол. наук

В.Н. Мельников

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В кишечнике обитает огромное количество микроорганизмов, которые играют важную роль в физиологических процессах организма хозяина, а также обеспечивают защиту от колонизации патогенами (Kamada et al., 2013; Gensollen et al., 2016; Pickard et al., 2017). Обнаружены многочисленные ассоциации изменения таксономического и функционального профиля микрофлоры с нарушениями физиологических процессов в организме хозяина, вовлекающими иммунную систему, пищеварение и метаболизм, нервную систему (Feng et al., 2018), перетекающими в патологические состояния.

Примером заболеваний, ассоциированных с нарушением микрофлоры, являются воспалительные заболевания кишечника (ВЗК). ВЗК – это хронические, рецидивирующие воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), к данной группе относят болезнь Крона и язвенный колит. Несмотря на то, что ВЗК являются серьезной проблемой в мировой медицине, их этиология до сих пор неясна (Ng et al., 2017). Считается, что ВЗК развиваются у предрасположенных индивидов под влиянием факторов окружающей среды, однако заболевания могут возникнуть и без выявленной генетической предрасположенности (Sartor, 2006). При ВЗК наблюдаются изменения микрофлоры (Matsuoka and Kanai, 2015) и нарушение кишечного барьера (Antoni et al., 2014), что может приводить к нарушению баланса иммунных реакций в кишечнике и способствовать развитию сильных воспалительных реакций. Вследствие многофакторности и неясной этиологии ВЗК, современные терапевтические подходы часто оказываются недостаточно эффективными. В связи с этим сейчас активно исследуются механизмы процессов, имеющих место при ВЗК, а также разные методы регуляции воспаления в кишечнике за счет воздействия, как на иммунную систему, так и на микрофлору кишечника. Одним из активно развивающихся направлений является исследование способов регуляции состава кишечной микрофлоры (Babickova and Gardlik, 2015). В частности, исследуются способы восстановления микрофлоры путем заселения кишечника бактериями при помощи пробиотиков (живые бактерии), воздействия на мукозальную иммунную систему хозяина постбиотиками (метаболиты, лизаты бактерий), а также ведутся разработки по получению пребиотиков (пищевых добавок, стимулирующих рост симбиотических бактерий) (Orel and Kamhi Trop, 2014; Vieira et al., 2016).

Для поддержания баланса между про- и противовоспалительными реакциями в кишечнике необходима точная регуляция состава микрофлоры и ее взаимодействия с клетками хозяина (Barbosa and Rescigno, 2010). В кишечнике микроорганизмы находятся в просвете и практически не взаимодействуют с

эпителиальными клетками благодаря специальному гелеобразному барьеру, основу которого составляет гликопротеин муцин2, а также различные противомикробные факторы (Johansson et al., 2008). Муцин2 – основной секреторный муцин в кишечнике, который синтезируется и выделяется бокаловидными клетками кишечного эпителия (Johansson et al., 2011). Он служит с одной стороны защитным барьером для эпителиальных клеток, а с другой – выступает в роли ниши для обитания кишечных бактерий. Некоторые бактерии могут расщеплять олигосахариды муцина2 и использовать полученные моносахариды в качестве источников энергии, а также отщеплять их для использования другими бактериями, которые не имеют ферментов для гидролиза олигосахаридов муцина2 (Bergstrom and Xia, 2013). Особенно важны остатки сахаров, находящихся в терминальном положении олигосахаридов, поскольку именно они наиболее доступны для бактерий в просвете кишечника. Одним из таких моносахаридов является фукоза, которая помимо источника энергии для бактерий, также выступает в роли важного фактора во взаимоотношениях хозяин-микроб, в том числе за счет регуляции распознавания некоторых бактерий (Pickard and Chervonsky, 2015). Нарушение фукозилирования в кишечнике может приводить к изменению состава микрофлоры (Kashyap et al., 2013) и снижению устойчивости к колонизации патогенами (Pham et al., 2014; Pickard et al., 2014). Благодаря своим свойствам фукоза исследуется в качестве модулятора микрофлоры. Появляются данные о том, что экзогенная фукоза, а также вещества, содержащие фукозу, могут оказывать влияние на состав микрофлоры, а также на иммунную функцию в кишечнике (He et al., 2019; Ke et al., 2020; Lean et al., 2015; Wu et al., 2018). Таким образом, дальнейшее изучение свойств фукозы может быть основой для разработки новых способов модуляции кишечной микрофлоры.

**Цель работы:** выявить роль муцина2 и его компонента – моносахарида L-фукозы в регуляции барьерной функции кишечника.

**Задачи исследования:**

1. Оценить влияние дефицита муцина2 на состав микрофлоры кишечника и иммунный статус мышей с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2<sup>-/-</sup>*);
2. Определить роль бактериальной микрофлоры кишечника в изменении иммунного статуса мышей *Muc2<sup>-/-</sup>*;
3. Установить роль моносахарида L-фукозы в регуляции микрофлоры кишечника у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* на фоне приема антибиотиков.

**Научная новизна работы.** В данной работе показано, что у мышей вследствие генетически обусловленного дефицита муцина2 (мыши *Muc2<sup>-/-</sup>*) происходит нарушение барьерной функции и развивается хроническое воспаление

в кишечнике. Также дефицит муцина<sup>2</sup> снижает устойчивость к колонизации кишечника мышей микроорганизмом *Tritrichomonas* sp. Таким образом, гликопротеин муцин<sup>2</sup> участвует в регуляции иммунных реакций и микрофлоры в кишечнике.

Нарушение бактериальной кишечной микрофлоры приводит к истощению и гибели *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей с сопутствующей инфекцией *Tritrichomonas* sp. При этом элиминация *Tritrichomonas* sp. или наличие муцина<sup>2</sup> в просвете кишечника не приводит к гибели мышей при обеднении микрофлоры. Таким образом, впервые продемонстрировано, что бактериальная микрофлора защищает мышей от цитотоксического действия протозойной инфекции в условиях нарушенного барьера в кишечнике.

Впервые на модели ВЗК показано, что антибактериальные препараты оказывают разнонаправленное действие на бактериальную микрофлору в зависимости от присутствия протозойной инфекции. При воздействии антибиотиков разнообразие микрофлоры у мышей с инфекцией *Tritrichomonas* sp. увеличивается, а у мышей без инфекции, наоборот, уменьшается. Количественное обеднение бактериальной микрофлоры при приеме антибиотиков наблюдается независимо от присутствия простейшего.

Впервые установлено, что один из компонентов гликопротеина муцина<sup>2</sup> моносахарид L-фукоза способствует угнетению *Tritrichomonas* sp. в кишечнике мышей на фоне нарушения бактериальной микрофлоры.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные могут способствовать пониманию некоторых аспектов патогенеза ВЗК. Во-первых, выявленные особенности иммунного статуса *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей могут способствовать пониманию механизмов развития хронического воспаления в кишечнике с генетически обусловленной нарушенной барьерной функцией. Во-вторых, результаты исследования указывают на возможные осложнения воздействия антибиотиков у индивидов с нарушениями барьерной функции в присутствии протозойной инфекции. В-третьих, основная часть исследований, связанных с ВЗК, посвящена изучению роли бактериальной микрофлоры, данных о вовлеченности других групп микроорганизмов гораздо меньше. Результаты, полученные в настоящем исследовании, демонстрируют необходимость подробного изучения обитающих в кишечнике простейших микроорганизмов и их влияние на физиологию хозяина.

В исследовании продемонстрирован угнетающий эффект моносахарида L-фукозы на *Tritrichomonas* sp. Дальнейшее исследование механизмов регуляции L-фукозой колонизации кишечника микроорганизмами расширит знания о

взаимодействии хозяин-микроб. А также может стать основой для разработки новых способов регуляции патологических состояний, связанных с микроорганизмами родов *Tritrichomonas* и *Trichomonas*, которые являются возбудителями заболеваний мочеполовой системы и желудочно-кишечного тракта человека, сельскохозяйственных и домашних животных.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Муцин2 снижает колонизацию кишечника мышей микроорганизмом *Tritrichomonas* sp.
2. При дефиците муцина2 симбиотическая бактериальная микрофлора защищает организм хозяина от цитотоксического воздействия протозойной инфекции *Tritrichomonas* sp.
3. Компонент муцина2 L-фукоза регулирует колонизацию простейшего *Tritrichomonas* sp. в кишечнике на фоне нарушения бактериальной микрофлоры. Дальнейшее исследование механизмов регуляции L-фукозой колонизации слизистых поверхностей простейшими может способствовать разработке новых способов элиминации протозойных инфекций.

#### **Методология исследования**

В исследовании все данные были получены в результате серии экспериментов с использованием мышей с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2<sup>-/-</sup>*), у которых нарушена барьерная функция в кишечнике. Мыши *Muc2<sup>-/-</sup>* являются широко используемой моделью для исследования ВЗК. Исследование было проведено в соответствии с Европейской директивой 86/609/ЕЕС153 и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для научных целей. Все манипуляции с животными были одобрены межинститутской комиссией по биоэтике СО РАН (протокол № 28 выдан 19.06.2015). Исследование проводилось на базе центра генетических ресурсов ИЦиГ СО РАН (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015), животные содержались в барьерных условиях, что позволило стандартизировать и контролировать кишечную микрофлору и присутствие вид специфических патогенов. Дизайн экспериментов с использованием однопометников *Muc2<sup>-/-</sup>* и *Muc2<sup>+/+</sup>*, полученных от скрещивания гетерозигот, позволил минимизировать материнские эффекты на микрофлору и иммунную систему.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Научные результаты, представленные в диссертации, являются достоверными, что подтверждается достаточными объемом материала, полученного в ходе выполнения экспериментов на проработанной модели, с использованием надежных современных методов анализа и адекватных методов статистической обработки.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на VI научно-практической конференции Rus-LASA (Рязань, 2017); на международной конференции 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (Канадзава, Япония, 2017); на VII научно-практической конференций Rus-LASA (Нижний Новгород, 2018); на всероссийской конференции «Объединенный иммунологический форум» (Новосибирск, 2019); на международной конференции 7th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (Вена, Австрия, 2019).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы 11 работ в изданиях, рекомендованных ВАК, 9 из них индексируются в WOS и SCOPUS.

**Объём и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 156 страницах текста, содержащего 29 рисунков, 3 таблицы и 13 страниц приложений к диссертации. Список литературы представлен 255 источниками литературы.

**Личный вклад автора.** Все эксперименты с животными были проведены автором совместно с научным руководителем к.б.н. Литвиновой Е.А. In vitro фертилизация и подсадка эмбрионов были выполнены к.б.н. Концевой Г.В. Метагеномный анализ микрофлоры был выполнен компанией Novogene (Китай). Секвенирование подготовленных образцов продуктов ПЦР было выполнено в ЦКП «Молекулярная и клеточная биология» ИМКБ СО РАН. Все остальные методы были освоены и выполнены лично автором работы, анализ количества фукозы и цитокинов и иммуноглобулинов и подсчет клеток в камере Горяева были выполнены совместно с научным руководителем.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н. Литвиновой Екатерине Анатольевне и коллегам: к.б.н. Кожевниковой Елене Николаевне, Борисовой Марии Александровне, а также д.б.н. проф. Мошкину Михаилу Павловичу и сотрудникам лаборатории генетики лабораторных животных ИЦиГ СО РАН, на базе которой была выполнена работа.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Животные, условия содержания, экспериментальные процедуры.** Исследование было выполнено в Центре генетических ресурсов ИЦиГ СО РАН (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015). В исследовании использовали животных, свободных от специфических патогенов (расширенный список FELASA, Verard *et al.*, 2014), а также животных, положительных на инфекцию *Helicobacter* spp. В процессе исследования у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* с инфекцией *Helicobacter*

spp. также был обнаружен микроорганизм, филогенетически близкий к видам, принадлежащим к роду *Tritrichomonas*. *Tritrichomonas* sp. детектировался у мышей с инфекцией, в список FELASA данные микроорганизмы не входят (Berard *et al.*, 2014). Мышей содержали однополовыми группами по 3-6 животных в индивидуально вентилируемых клетках (Optimice, США) при искусственном световом режиме 14С:10Т, при температуре 20-22°C, влажности 36%. В качестве подстилки использовали обеспыленную березовую стружку. Животные получали корм ssniff® R/M-H autoclavable V1534-3 (Ssniff, Германия) *ad libitum*. В качестве питьевой воды животным предоставляли стерильную деионизированную воду с добавлением минералов K<sup>+</sup>, Mg2<sup>+</sup> («Северянка», Санкт-Петербург) *ad libitum*.

Были проведены семь экспериментов: эксперименты №1 и 2 проводили на мышах линий C57BL/6, свободных от патогенов, и *Muc2*<sup>-/-</sup> (с нокаутом гена *Muc2*), с инфекцией *Helicobacter* spp. В ходе выполнения эксперимента №2 у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> также был обнаружен микроорганизм *Tritrichomonas* sp. Дальнейшие эксперименты (№3, 4, 5, 6, 7) проводились на мышах *Muc2*<sup>-/-</sup> и *Muc2*<sup>+/+</sup>, рожденных с инфекциями *Helicobacter* spp. и *Tritrichomonas* sp., а также без инфекций. Мыши были получены от скрещивания мышей *Muc2*<sup>+/-</sup>. Мыши *Muc2*<sup>+/-</sup>, свободные от патогенов, были получены путем *in vitro* фертилизации с последующей подсадкой эмбрионов (Litvinova *et al.*, 2017). Мыши *Muc2*<sup>+/-</sup> с инфекциями *Helicobacter* spp. и *Tritrichomonas* sp. были получены, путем трехкратного введения суспензии фекалий от зараженных животных мышам, свободным от инфекций (Схема заражения и скрещивания животных представлена на Рисунке 1).

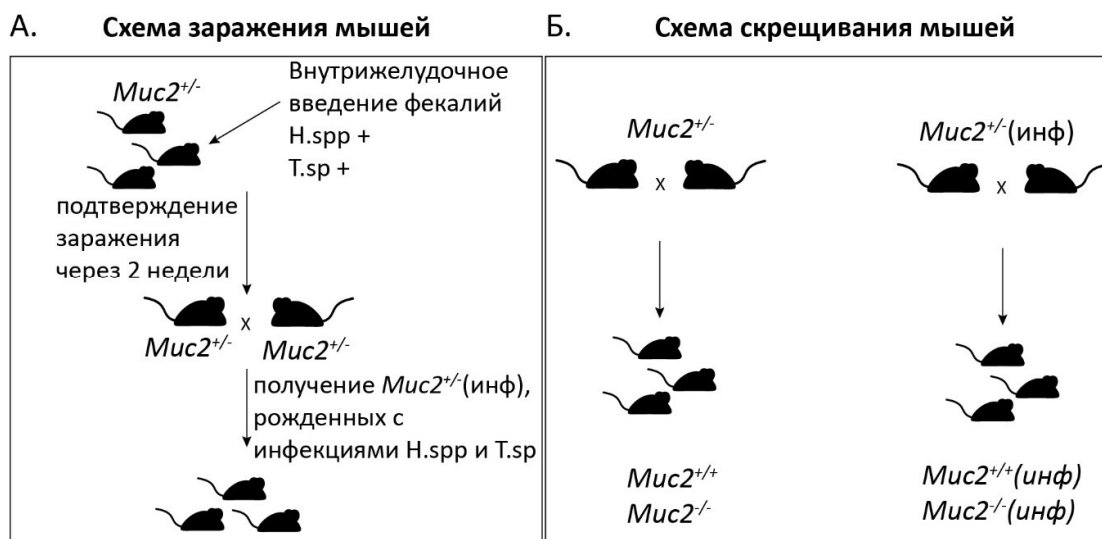


Рисунок 1. А. Схема заражения мышей *Tritrichomonas* sp. (*T.sp*) и *Helicobacter* spp. (*H.spp*). Б. Схема скрещивания мышей.



В экспериментах мыши получали антибиотики согласно нескольким схемам: 1) *ad libitum* в течение двух недель с питьевой водой (смесь кларитромицина – 0,1875 мг/мл, метронидазола – 0,1875 мг/мл, амоксициллина – 0,5625 мг/мл); 2) раз в сутки путем внутрижелудочного введения в течение двух недель (суточная доза составляла 0,46 мг в день для кларитромицина и метронидазола, 1,38 мг для амоксициллина); 3) внутрижелудочно в течение 7 дней, а затем 7 дней с питьевой водой *ad libitum*. L-фукозу животные получали *ad libitum* с питьевой водой в концентрации 0,1% в сочетании с воздействием антибиотиками. Схемы предоставления антибиотиков были направлены на модуляцию кишечной микрофлоры: 1) обеднение симбиотической микрофлоры и элиминацию *Helicobacter* spp. (схема 1); 2) обеднение симбиотической микрофлоры и элиминацию инфекции *Tritrichomonas* sp. (схема 2); 3) обеднение симбиотической микрофлоры и недостаточное угнетение *Tritrichomonas* sp. (схема 3).

**Оценка общего состояния животных и физиологических показателей.** Для того чтобы оценить общее состояние в течение эксперимента, определялась масса тела мышей, а также оценивались внешние признаки, такие как состояние волосяных покровов, консистенция фекальных масс, наличие ректального кровотечения, подвижность животного. Клеточность крови и органов иммунной системы определялись путем подсчета клеток под микроскопом в камере Горяева, а также при помощи цитофлуориметра Guava easyCyte 8HT Flow Cytometer (Merck, Германия). Концентрацию внутриклеточных ферментов, концентрацию лактата в крови определяли при помощи коммерческих наборов (ОЛЬВЕКС Диагностикум, Россия) биохимическим методом.

**Оценка иммунных показателей.** Для оценки воспаления в кишечнике проводили гистологический анализ толстой кишки. Образцы фиксировали в 10% формалине, обезжировали в спиртах восходящей концентрации, последовательно проводили через бутанол и ксилол, а затем заключали в парафин. Готовили срезы толщиной 3 мкм и окрашивали их с помощью двух окрашиваний: на ШИК-реакцию и азур-2-эозином (БиоВитрум, Россия). При помощи ШИК-реакции выявляли секрет бокаловидных клеток, а также количество ядер в крипте (анализ проводили на 15 криптах, выбранных случайным образом). При помощи окрашивания азур-2-эозином выявляли иммунные клетки и наличие признаков воспаления. Количество иммунных клеток считали в 15 полях зрения и выражали как N клеток/15 полей зрения.

Субпопуляции лимфоцитов в крови, тимусе, селезенке, мезентериальных лимфатических узлах (ЛУ) оценивали при помощи проточной цитофлуориметрии на цитометре Guava easyCyte 8HT Flow Cytometer (Merck, Германия). Для получения суспензии лейкоцитов крови, эритроциты лизировали при помощи гипотонического буфера, содержащего  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , и промывали натрий-фосфатным буфером, содержащим

2% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Для получения суспензии спленоцитов селезенку гомогенизировали, клетки пропускали через клеточные сеточки (размер пор 70 мкм), лизировали эритроциты и промывали. Для получения суспензии лимфоцитов тимуса и мезентериальных ЛУ органы гомогенизировали, пропускали клетки через клеточные сеточки (размер пор 70 мкм) и промывали. Лимфоциты анализировали при помощи окрашивания поверхностных маркеров лимфоцитов антителами с флуоресцентными метками (BioLegend, США). Для внутриклеточного окрашивания белка Foxp3 клетки фиксировали и пермобилизировали при помощи коммерческих реактивов True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (BioLegend, США).

Количество иммуноглобулинов в кишечнике и крови, а также количество цитокина IL-1 $\beta$  определяли методом ИФА.

Экспрессию генов иммунных факторов в ткани толстой кишки оценивали при помощи метода количественной ПЦР в реальном времени по уровню кДНК, синтезированной с мРНК целевого гена, нормированному на кДНК, синтезированной с мРНК гена бета-тубулина (*Tubb5*) по формуле  $2^{(Ct_{Tubb}-Ct_{\text{целевого гена}})}$ . РНК из ткани толстой кишки выделяли при помощи TRIzol reagent (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя, затем образцы РНК обрабатывали ДНКазой I (Roche, Германия) и осаждали 96% этанолом. Образцы кДНК получали путем проведения реакции обратной транскрипции с матрицы РНК при помощи обратной транскриптазы MuLV (СибЭнзим, Россия) согласно рекомендациям производителя.

**Оценка качественного и количественного состава микрофлоры кишечника.** Состав бактериальной микрофлоры кишечника мышей оценивали путем анализа ДНК бактерий в фекалиях. ДНК из фекалий выделяли на SiO<sub>2</sub>, с использованием растворов для выделения ДНК (Qiagen, Германия). Для качественной оценки бактериальной микрофлоры использовали анализ SSCP ДНК гена 16S рРНК бактерий (за основу брали метод Schwieger and Tebbe, 1998). Количественный анализ бактериального состава микрофлоры проводили при помощи метода ПЦР в реальном времени. Метагеномный анализ кишечной микрофлоры проводили путем секвенирования гена 16S рРНК (регионы V3-V4) в образцах ДНК, выделенных их фекалий. ДНК для метагеномного анализа выделяли при помощи набора QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Германия), дальнейшая подготовка образцов (синтез ампликонов и создание библиотек), секвенирование на платформе Illumina и обработка данных осуществлялись компанией Novogene (Китай).

Для определения обнаруженного микроорганизма *Tritrichomonas* sp. было проведено секвенирование ДНК гена 18S рРНК по Сэнгеру (секвенирование проводили в ЦКП «Молекулярная и клеточная биология» ИМКБ СО РАН). В

результате секвенирования была получена последовательность ДНК длиной 1355 нуклеотидов. Полученную последовательность исследовали при помощи алгоритма поиска BLAST. Для филогенетического анализа отобрали 11 наиболее близких последовательностей, которые выровняли при помощи алгоритма MUSCLE и на основе выравнивания построили филогенетическое дерево при помощи онлайн-сервиса IQ-tree, а затем дерево визуализировали при помощи программы FigTree. Количественную оценку присутствия обнаруженного микроорганизма в кишечнике мышей проводили при помощи специфичных к отсеквенированной последовательности праймеров методом ПЦР в реальном времени.

**Статистическая обработка результатов.** Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи программного обеспечения Statistica 6.0. Выборки данных проверяли на нормальность распределения при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. Динамика изменения массы животных была исследована при помощи анализа ANOVA с повторными измерениями (repeated measures ANOVA). Для анализа выборок, не описываемых нормальным распределением, использовали непараметрические методы статистической обработки. Факторный анализ проводили методом Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis test), сравнение между группами проводили при помощи критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test) и точного теста Фишера (Fisher exact test).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Дефицит муцина2 приводит к развитию хронического воспаления в кишечнике у мышей**

Анализ срезов ткани восходящего отдела толстой кишки не выявил признаков острого воспаления в кишечнике (отек, эрозия эпителия, лейкоцитарные инфильтраты) у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>*, однако была обнаружена гиперплазия крипт, а также большее количество лейкоцитов по сравнению с мышами C57BL/6 (Рисунок 2). То есть, в кишечнике у мутантных мышей, даже в присутствии инфекционного агента *Helicobacter* spp., не было обнаружено активного воспалительного процесса, но наблюдались признаки хронического воспаления.

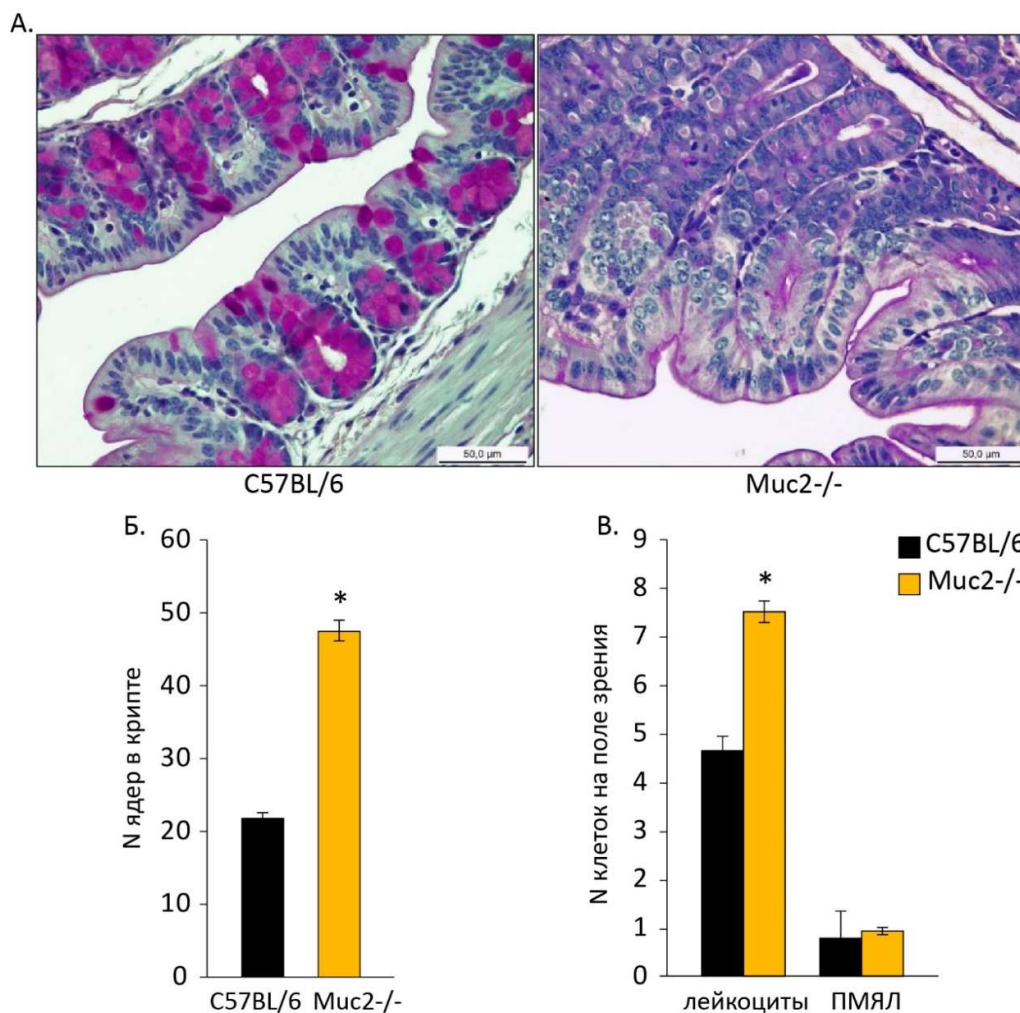


Рисунок 2. Анализ гистологических срезов ткани толстой кишки мышей. А. Фотографии препаратов, окрашенных на ШИК-реакцию, увеличение  $\times 400$ . Розовым цветом окрашен ШИК-позитивный секрет бокаловидных клеток. Б. Количественная оценка гиперплазии крипт (количество ядер в крипте). В. Общее количество лейкоцитов и количество полиморфноядерных лейкоцитов на срезах ткани толстой кишки. *Количество животных в группе: Б, В –  $n(\text{C57BL/6})=4$ ,  $n(\text{Muc2}^{-/-})=4$ ; Г –  $n(\text{C57BL/6})=3$ ,  $n(\text{Muc2}^{-/-})=6$ . \* –  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney U-test*

Исследование экспрессии генов, вовлеченных в воспалительные реакции, показало повышение экспрессии провоспалительных цитокинов *Tnf* и *Il1b* у мутантных мышей по сравнению с C57BL/6. Также было обнаружено увеличение экспрессии генов транскрипционных факторов Т-клеток *Rorc* (Th17) и *Foxp3* (Treg), при этом экспрессия гена транскрипционного фактора *Tbx21*, характерного для Th1, не повышалась (Рисунок 3). Также было обнаружено, что в кишечнике мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> была повышена экспрессия аргиназы1 – фермента макрофагов. Продукция этого фермента свойственна макрофагам 2-го типа (M2), которые характеризуются противовоспалительными свойствами, стимулируют восстановление поврежденных тканей, а также играют роль в процессах образования опухолей (Sharouri-Moghaddam

et al., 2018). Также об усиленном восстановлении ткани кишки у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей свидетельствует увеличение экспрессии фактора trefoil factor 3 (*Tff3*), выделяемого бокаловидными клетками (Kim and Ho, 2010). Помимо этого, у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей было обнаружено повышение экспрессии гена *Pstg2* (циклооксигеназа2). Фермент циклооксигеназа2 нарабатывается макрофагами и участвует в синтезе медиаторов воспаления, что стимулирует провоспалительные реакции иммунной системы. Таким образом, воспаление в кишечнике у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* можно охарактеризовать как хроническое воспаление с активацией как про-, так и противовоспалительных реакций, а также механизмов усиленного восстановления ткани.

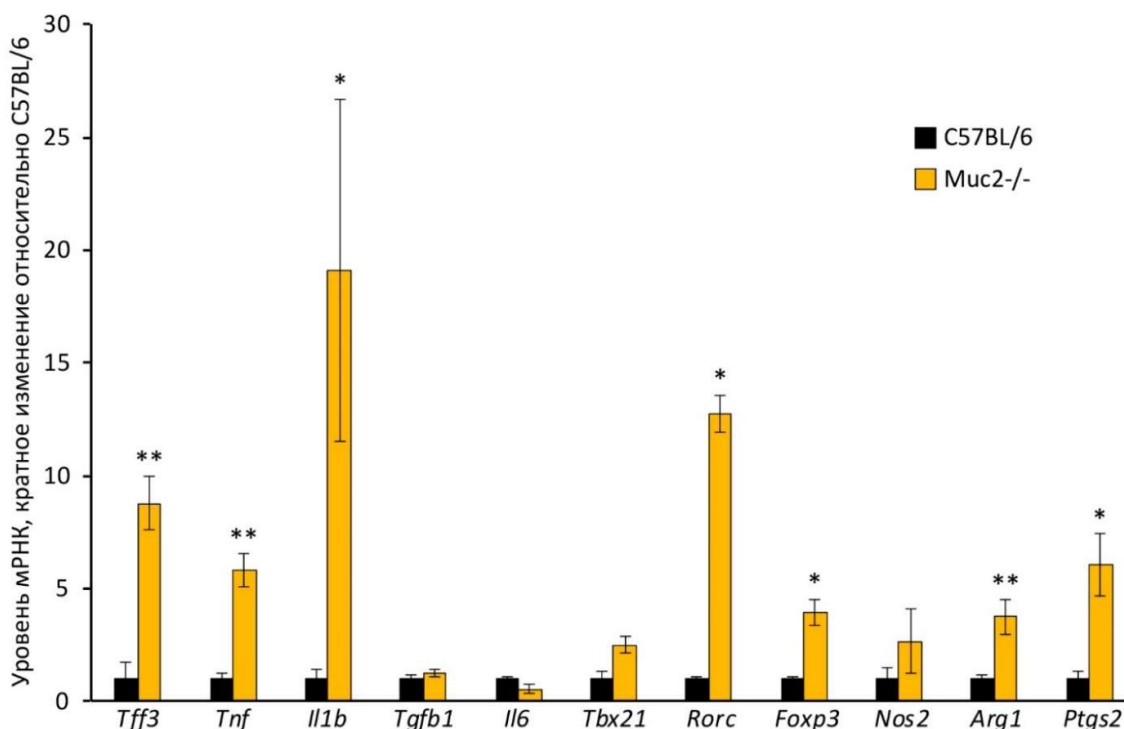


Рисунок 3. Экспрессия генов в ткани толстой кишки мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* и C57BL/6 (относительное количество мРНК, изменение относительно C57BL/6, принятого за единицу). Количество мРНК целевого гена нормировано на количество мРНК бета-тубулина. Количество животных в группе:  $n(C57BL/6)=4$ ,  $n(Muc2^{-/-})=8$ . \* -  $p<0,05$ ; \*\* -  $p<0,01$ ; Mann-Whitney U-test

В условиях нарушенной барьерной функции в кишечнике микроорганизмы могут вступать в более тесное взаимодействие с клетками хозяина, что может приводить к активации различных компонентов иммунной системы. Иммуноглобулины играют важную роль в иммунном ответе и выведении микроорганизмов из организма хозяина (Chen *et al.*, 2020). Анализ иммуноглобулинов показал, что у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей было больше IgG в толстой кишке по сравнению с C57BL/6, при этом количество IgA не отличалось. Помимо этого, в крови у

мутантных мышей было обнаружено больше IgG против собственной кишечной микрофлоры, чем у C57BL/6 (Рисунок 4).

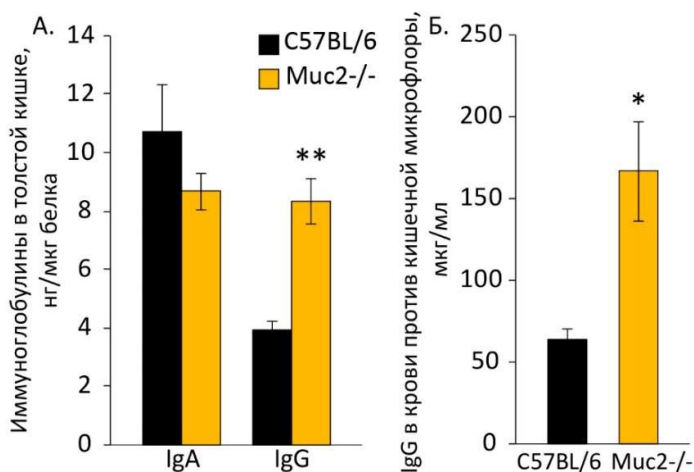


Рисунок 4. Количество иммуноглобулинов в толстой кишке и крови мышей. А. Количество IgA и IgG в толстой кишке мышей. Б. Количество IgG против собственной кишечной микрофлоры, обнаруженного в крови мышей. *Количество мышей в группе: для IgA –  $n(C57BL/6) = 6$ ,  $n(Muc2^{-/-}) = 8$ ; для IgG –  $n(C57BL/6) = 4$ ,  $n(Muc2^{-/-}) = 8$ . \*, \*\* -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test*

Полученные результаты могут говорить о том, что из-за дефицита муцина2 в кишечнике Muc2<sup>-/-</sup> мышей, вследствие тесного контакта иммунной системы с микрофлорой, могут быть активированы различные иммунные механизмы, способствующие усиленному восстановлению ткани и поддержанию хронического воспаления в кишечнике.

#### **Обеднение бактериальной микрофлоры Muc2<sup>-/-</sup> мышей, рожденных с инфекцией, приводило к истощению и гибели**

Воздействие на микрофлору мышей антибиотиками широкого спектра действия (смесь кларитромицина, метронидазола, амоксициллина) приводило к сильному снижению массы тела мутантных мышей, около 37% мышей погибали (5 из 14 мышей). Мыши C57BL/6 к концу эксперимента восстанавливались, 100% из них выживали (8 из 8 мышей) (Рисунок 5). При этом прием антибиотиков вызывал значительное обеднение кишечной микрофлоры у мышей обеих линий. Стоит отметить, что инфекционный агент *Helicobacter* spp., который присутствовал у мутантных мышей, также угнетался антибиотиками (Рисунок 6).

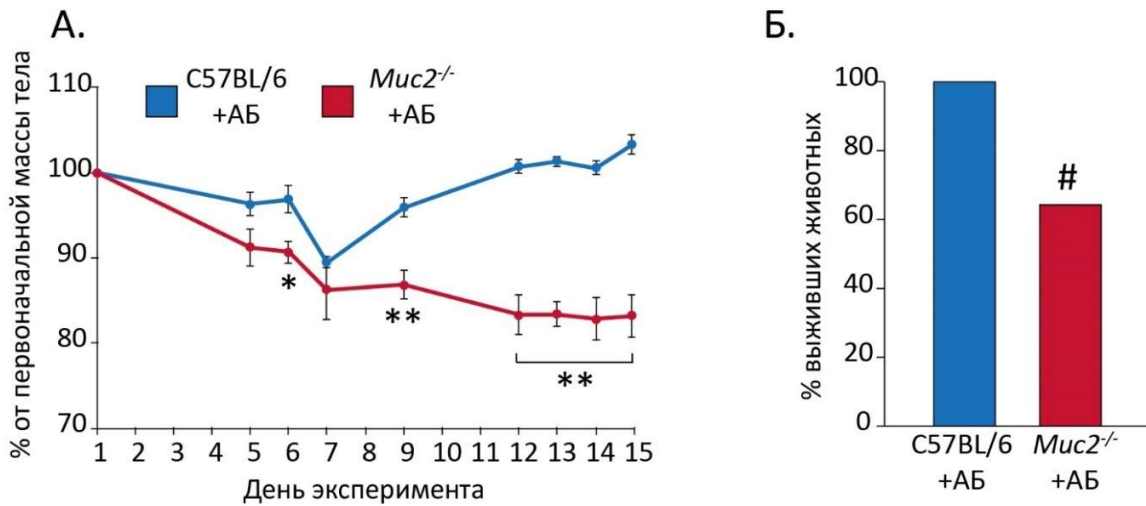


Рисунок 5. А. Динамика изменения массы тела мышей относительно первоначальной массы. \*, \*\*\* -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ; различия между «C57BL/6+АБ» и «Muc2<sup>-/-</sup>+АБ», Fisher LSD. Б. Процент выживших мышей. # -  $p < 0,05$ ; Fisher exact test

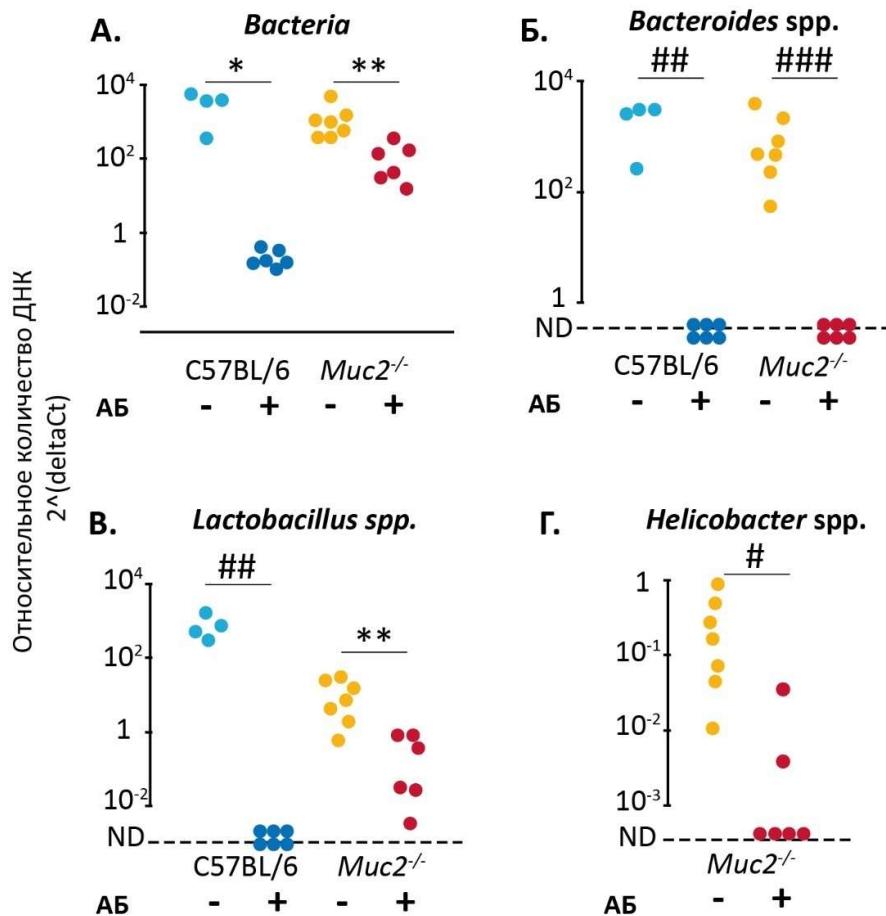
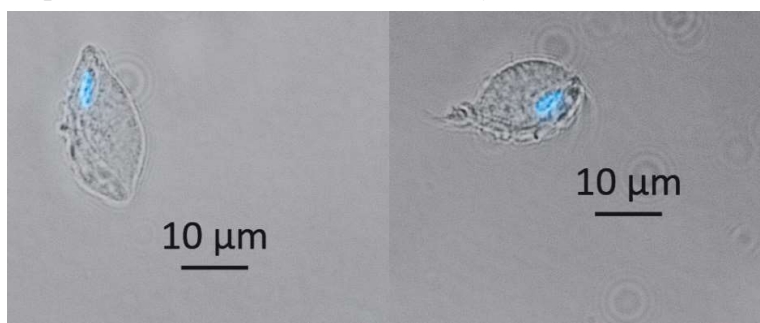


Рисунок 6. Количество бактериальной 16S rRNA ДНК в фекалиях мышей C57BL/6 и Muc2<sup>-/-</sup>, нормированное на 28S rRNA ДНК мыши. А. Количество общей бактериальной ДНК 16S rRNA. Б. Количество ДНК 16S rRNA *Bacteroides* spp. В. Количество ДНК 16S rRNA *Lactobacillus* spp. Г. Количество ДНК 16S rRNA *Helicobacter* spp. ND – количество ДНК ниже уровня детекции. \*, \*\* -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test; #, ##, ### –  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ; Fisher exact test

Помимо этого, в содержимом кишечника мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* был обнаружен микроорганизм, который по морфологическим признакам был похож на представителя рода *Tritrichomonas* (Рисунок 7А). Для того чтобы точно определить принадлежность микроорганизма к *Tritrichomonas* spp. было проведено секвенирование ДНК гена 18S rRNA простейшего. Для полученной последовательности *Tritrichomonas* sp. clone Tsp1019 (загружена в базу данных GenBank, Accession Number MT804340) был проведен филогенетический анализ, который подтвердил близкое родство обнаруженного микроорганизма, к видам *Tritrichomonas*. Самыми филогенетически близкими оказались *Tritrichomonas* sp. strain L55, *Tritrichomonas muris* и *Tritrichomonas musculus* (*Tritrichomonas* sp. MEG-2016a) (Рисунок 7Б). Таким образом, в кишечнике мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* была не только инфекция *Helicobacter* spp., но и микроорганизм *Tritrichomonas* sp., который обнаруживался и у мышей, принимавших антибиотики. Присутствие этого микроорганизма при обеднении микрофлоры в условиях нарушенного барьера в кишечнике могло быть причиной истощения и гибели мутантных мышей.



А.  
Б.

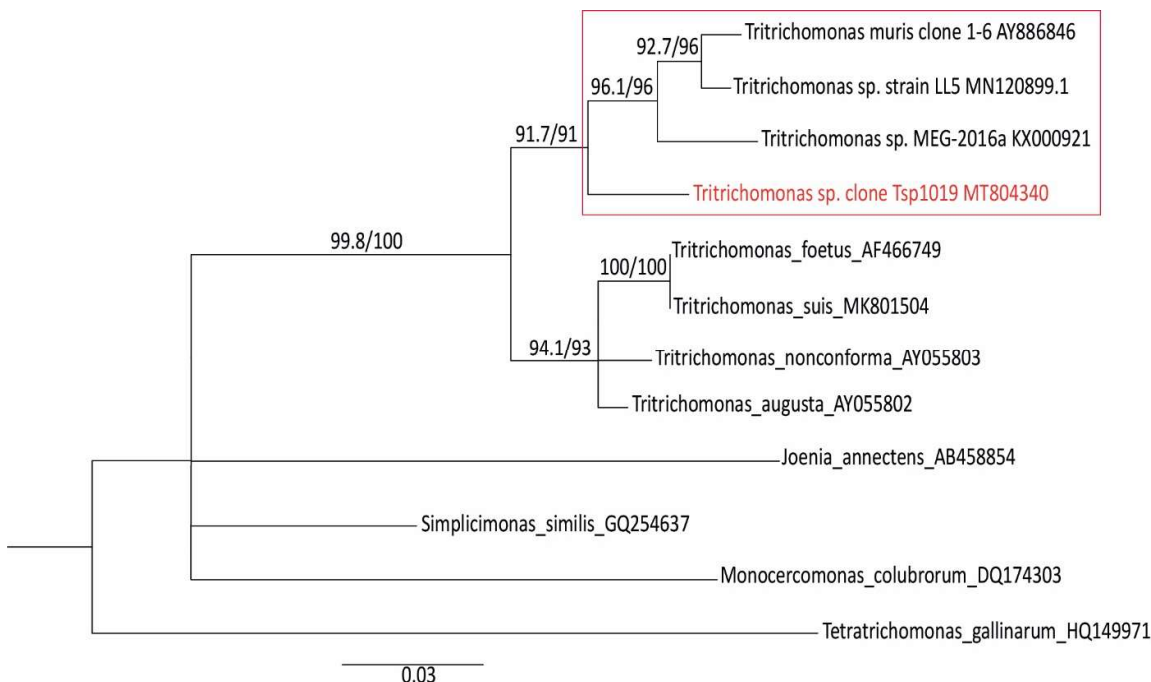




Рисунок 7. А. Микрофотография простейшего, *Tritrichomonas* sp. обнаруженного в содержимом кишечника мышей *Muc2*<sup>-/-</sup>. Ядро визуализировано при помощи красителя Hoechst 33258. Б. Филогенетическое дерево построено на основе анализа последовательности ДНК 18S rRNA *Tritrichomonas* sp. (clone Tsp1019) при помощи алгоритма BLAST.

**Воздействие антибиотиков на микрофлору свободных от инфекции *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей не оказывало влияния на их жизнеспособность**

Для того чтобы выявить роль присутствия инфекций в наблюдаемой гибели мышей при обеднении бактериальной микрофлоры, мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> освободили от инфекций путем редеривации. Оказалось, что обеднение бактериальной микрофлоры не приводит к гибели мутантных мышей, свободных от инфекций (выжили 10 из 10 мышей). Бактерии играют важную роль в поддержании гомеостаза в кишечнике за счет регуляции обновления эпителиальных клеток и репарации ткани (Park et al., 2016, Rakoff-Nahoum et al., 2004), а также за счет регуляции колонизации патогенами (Kamada et al., 2013). Мы предположили, что кишечные бактерии играют роль в регуляции протозойной инфекции *Tritrichomonas* sp. у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup>.

Примечательно, что антибиотики влияли на микрофлору мышей после редеривации несколько иным образом, нежели в предыдущем эксперименте. У мышей после антибиотиков *Bacteroides* spp. снижались, но оставались на детектируемом уровне (Рисунок 8). Вероятно, унаследованная от суррогатной матери микрофлора отличалась от микрофлоры мышей с инфекциями. Также реакция микрофлоры мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> и *Muc2*<sup>+/+</sup> на антибиотики была очень похожей. В связи с этим, в последующих экспериментах использовались мыши *Muc2*<sup>-/-</sup>, а также их однопометники *Muc2*<sup>+/+</sup> в качестве контроля.

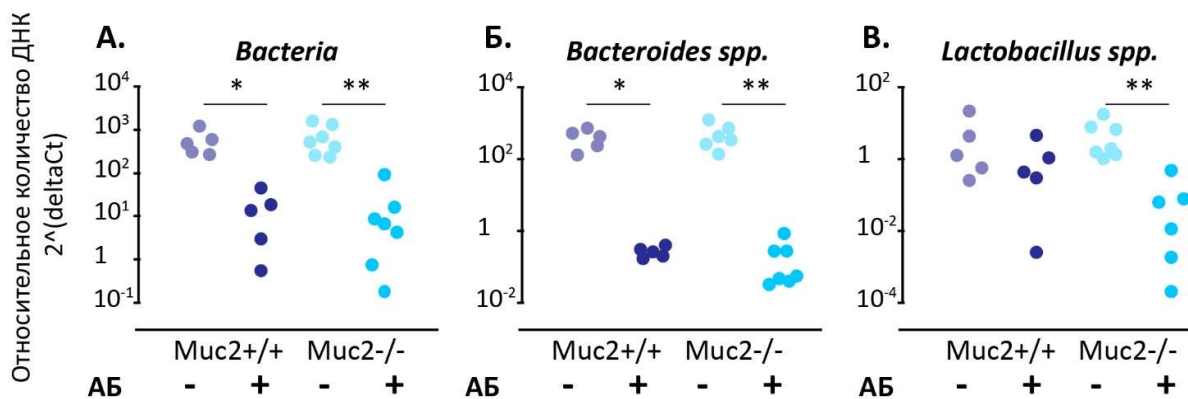


Рисунок 8. Количество бактериальной ДНК в фекалиях *Muc2*<sup>-/-</sup> и *Muc2*<sup>+/+</sup> мышей свободных от инфекции (относительно ДНК мыши 28S rRNA). А. Количество общей бактериальной ДНК 16S rRNA. Б. Количество ДНК 16S rRNA *Bacteroides* spp. В. Количество ДНК 16S rRNA *Lactobacillus* spp. \*\* -  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test

**Наличие муцина2 способствовало устойчивости к колонизации кишечника *Tritrichomonas* sp.**

Для того чтобы минимизировать материнские эффекты на микрофлору и иммунную систему, животных для дальнейших экспериментов получали путем гетерозиготного скрещивания. А поскольку редеривация привела к изменению микрофлоры, то мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* с инфекциями получали от гетерозиготных животных без инфекций, зараженных путем внутрижелудочного введения суспензии фекалий от зараженных животных (схема получения животных представлена выше, на рисунке 1). Для того чтобы оценить выравнивание микрофлоры при такой схеме скрещивания, был проведен качественный анализ бактериального состава кишечника методом одноцепочечного конформационного полиморфизма ДНК гена 16S rRNA. Из результатов анализа, представленных на рисунке 9, видно, что микрофлора животных всех групп была очень похожа (большинство сигналов ДНК совпадали). При этом следует отметить, что такой подход выявляет наиболее представленные виды бактерий, но не исключает различий в количественной представленности отдельных видов.

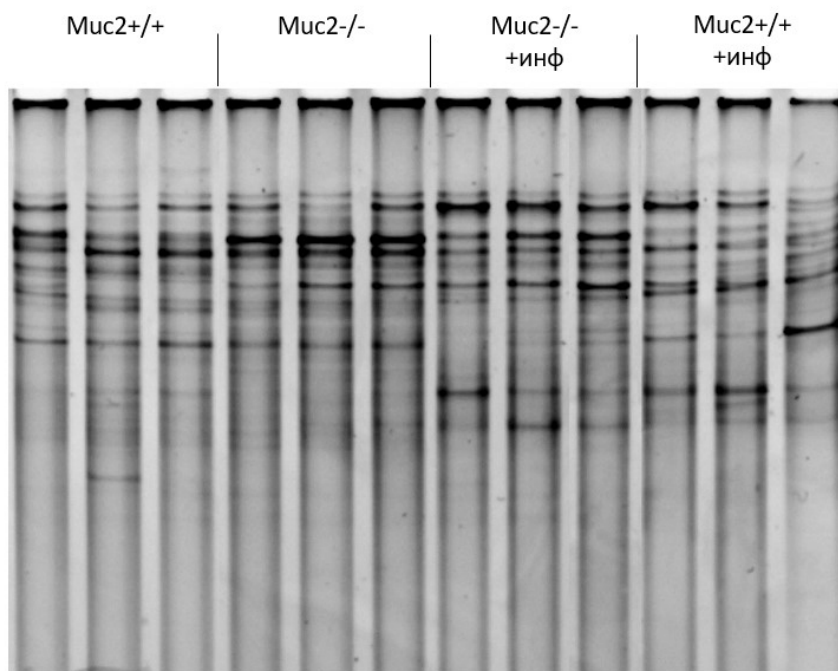


Рисунок 9. Качественный анализ бактериального состава микрофлоры (SSCP ДНК 16S rRNA) в фекалиях мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* и *Muc2<sup>+/+</sup>*, рожденных с инфекциями и без.

Помимо исследования бактериальной микрофлоры, был также проведен количественный анализ *Tritrichomonas* sp. в фекалиях. Оказалось, что у мышей *Muc2<sup>+/+</sup>* с нормальной барьерной функцией колонизация кишечника микроорганизмом была значительно снижена по сравнению с мутантными одноплетниками (Рисунок 10). Таким образом, муцин2 участвует в регуляции кишечной микрофлоры и защищает кишечник от колонизации простейшим.

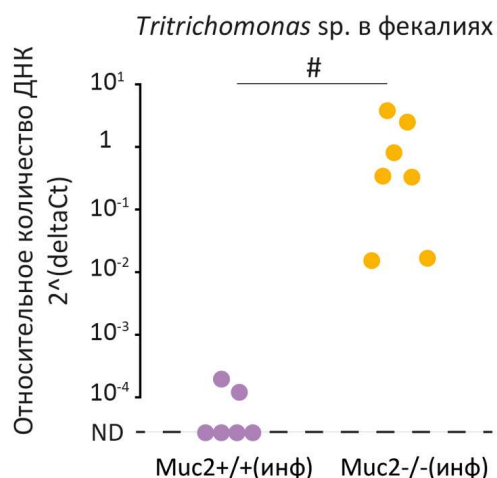


Рисунок 10. Количество ДНК *Tritrichomonas* sp. (относительно ДНК 28S rRNA мыши) в фекалиях однопометников *Muc2*<sup>+/+</sup> и *Muc2*<sup>-/-</sup>. ND – количество ДНК ниже уровня детекции. # -  $p < 0,05$ ; Fisher Exact Test

### Элиминация инфекции *Tritrichomonas* sp. на фоне обеднения бактериальной микрофлоры кишечника способствовала выживанию *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей

Для того чтобы проверить предположение о роли кишечных бактерий в регуляции протозойной инфекции, была использована другая схема предоставления антибиотиков. *Muc2*<sup>-/-</sup> мыши, рожденные с инфекциями, получали смесь антибиотиков (кларитромицин, амоксициллин, метронидазол) ежедневно в течение двух недель путем внутрижелудочного введения. При этом используемая суточная доза антибиотиков соответствовала дозе из предыдущих экспериментов. Используемая концентрация метронидазола соответствовала той, которую применяют для подавления инфекций *Tritrichomonas* spp. у мышей (Cobo *et al.*, 2011).

Предоставление антибиотиков вызывало снижение массы тела мышей со 2-го по 5-й день эксперимента, а на 7-й день масса мышей восстановилась и не отличалась от контрольной группы. После двухнедельного приема антибиотиков мыши не демонстрировали истощения и гибели. Такой эффект сочетался со снижением количества ДНК *Tritrichomonas* sp. в фекалиях, а также обеднением бактериальной микрофлоры кишечника (Рисунок 11). Таким образом, обеднение бактериальной микрофлоры в сочетании с подавлением инфекции *Tritrichomonas* sp. не приводило к истощению и гибели *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей. Такой результат подтвердил наше предположение о защитной функции бактериальной микрофлоры при нарушенном барьере кишечника.

При инфицировании простейшие *Tritrichomonas* spp. прикрепляются к эпителиальным клеткам хозяина, что приводит к гибели клеток и, как следствие, к нарушению барьерной функции (Tolbert *et al.*, 2016). Мы предположили, что

нарушение бактериальной микрофлоры может приводить к усилению цитотоксического воздействия *Tritrichomonas* spp. в условиях отсутствия муцина2.

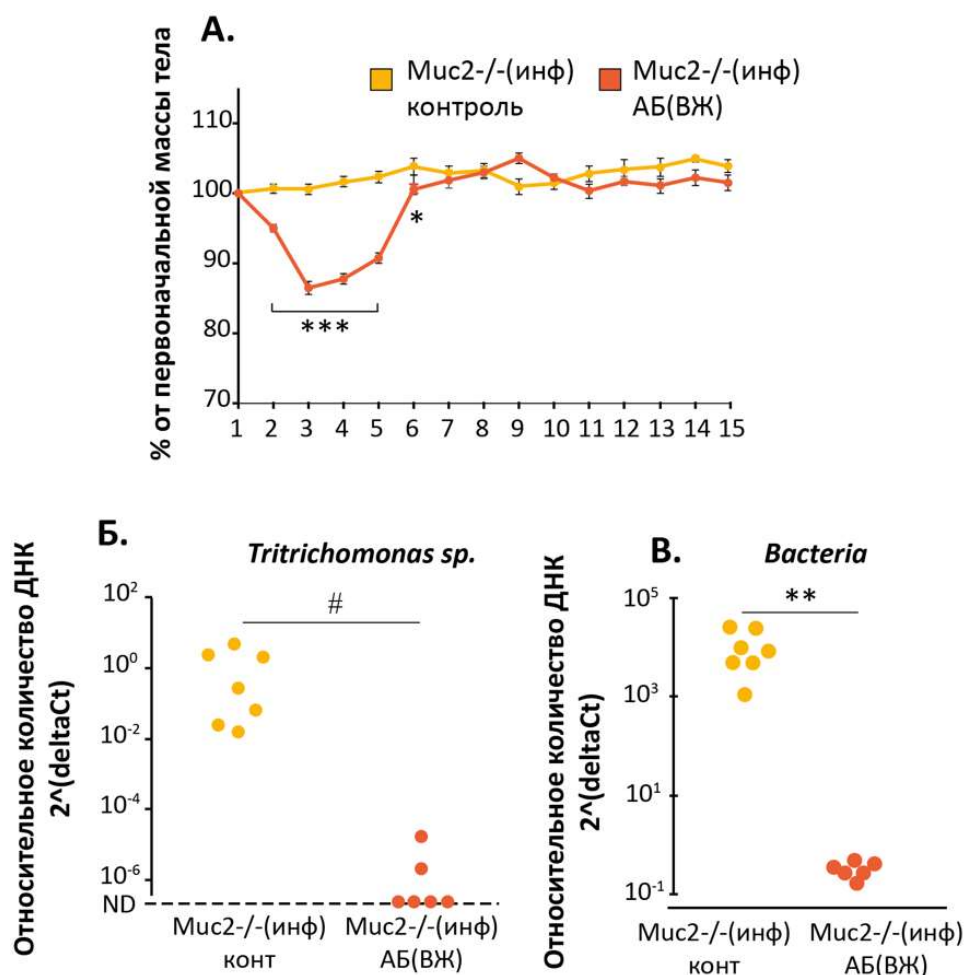


Рисунок 11. Масса тела и микрофлора мышей *Muc2*<sup>-/-</sup>, рожденных с инфекциями, после внутрижелудочного введения антибиотиков. А. Изменение массы тела мышей. Количество мышей в группе:  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{инф/конт}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{инф/АБ-ВЖ}) = 6$  \*, \*\*\* -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ; Fisher LSD test В. Количество 18S rRNA ДНК *Tritrichomonas* sp. и 16S rRNA ДНК бактерий в фекалиях мышей (относительно 28S rRNA ДНК мыши) ND – количество ДНК ниже уровня детекции. # -  $p < 0,05$ ; Fisher exact test; \*\* -  $p < 0,01$  Mann-Whitney U-test

### **L-фукоза регулировала колонизацию кишечника *Tritrichomonas* sp. и предотвращала гибель *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей с инфекцией при обеднении микрофлоры**

В следующем эксперименте была сделана попытка восстановить бактериальную микрофлору мышей путем добавления L-фукозы к антибиотикам. Мышам вводили антибиотики внутрижелудочно в течение 7 дней, а затем антибиотики добавляли в питьевую воду в течение следующих 7 дней. L-фукозу добавляли в питьевую воду на протяжении всего эксперимента (Рисунок 12А). При такой схеме обеспечивалось достаточное угнетение бактериальной микрофлоры, и недостаточное угнетение *Tritrichomonas* sp.

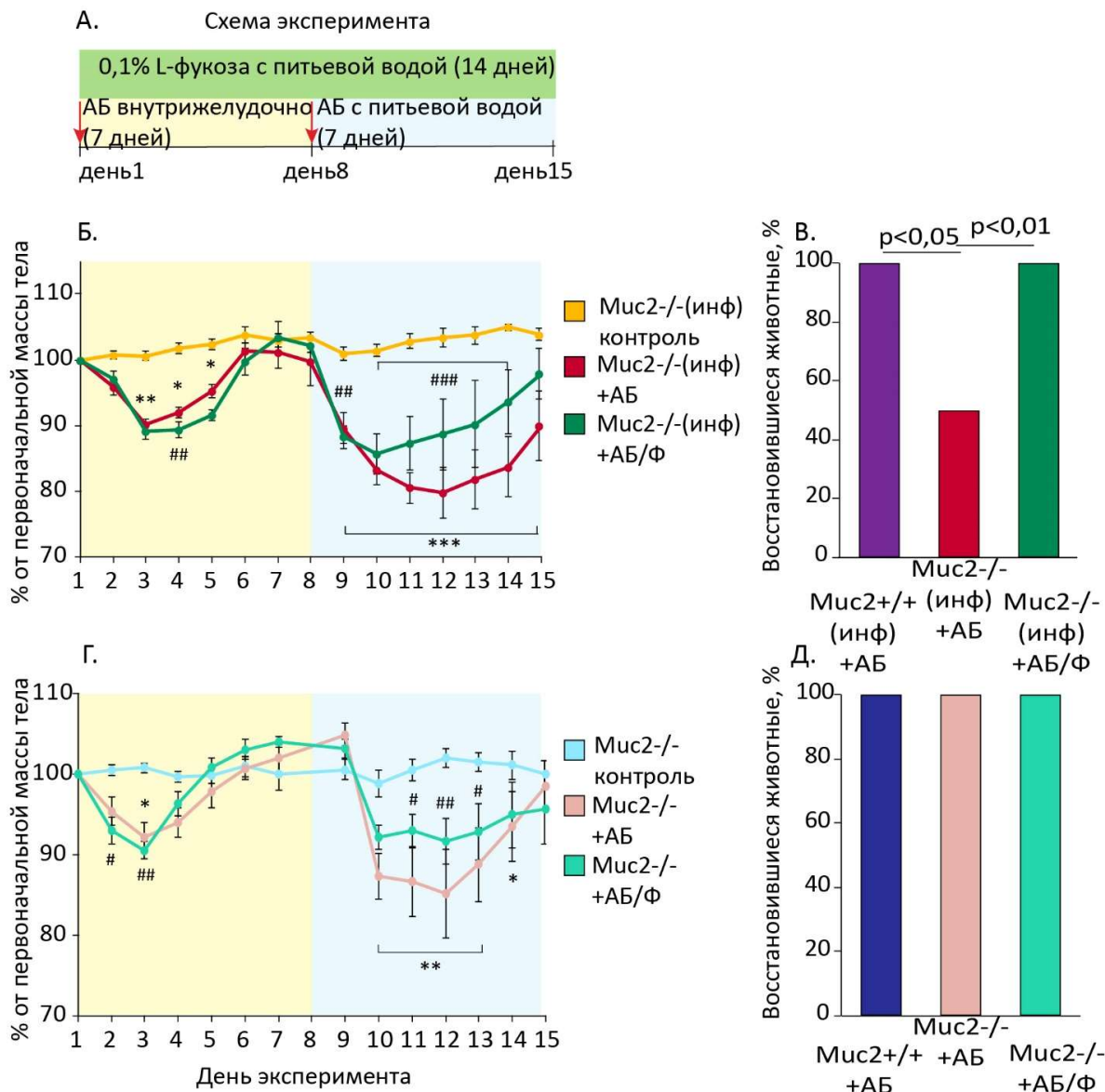


Рисунок 12. Масса тела *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей после приема антибиотиков и L-фукозы. А. Схема эксперимента. АБ – антибиотики. Б. Процент от первоначальной массы тела *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей с инфекциями. \*, \*\*, \*\*\* -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  различия между группами «*Muc2*<sup>-/-</sup> инф+АБ» и «*Muc2*<sup>-/-</sup> инф/конт»; ##, ### -  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  различия между группами «*Muc2*<sup>-/-</sup> инф+АБ/Ф» и «*Muc2*<sup>-/-</sup> инф/конт». Количество мышей в группе:  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{инф}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{инф}+\text{АБ}) = 8$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{инф}+\text{АБ}/\text{Ф}) = 7$ . В. Процент восстановившихся мышей с инфекциями. Межгрупповые сравнения проведены при помощи Fisher exact test. Г. Процент от первоначальной массы тела *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей без инфекций. \*, \*\* -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  различия между группами «*Muc2*<sup>-/-</sup>+АБ» и «*Muc2*<sup>-/-</sup>-конт» #, ## -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  различия между группами «*Muc2*<sup>-/-</sup>+АБ/Ф» и «*Muc2*<sup>-/-</sup>-конт» Количество мышей в группе:  $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 6$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}/\text{Ф}) = 7$ . Д. Процент восстановившихся мышей без инфекций.

Масса мутантных мышей с инфекцией во время внутрижелудочного введения антибиотиков сначала снижалась, а после семи дней приема антибиотиков мыши восстанавливались (аналогично предыдущему эксперименту). После смены метода предоставления антибиотиков (на 8-й день) мутантные мыши демонстрировали

резкое снижение массы тела. При этом 50% мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* с инфекцией, получавших антибиотики, на 13-й день эксперимента теряли до 35% массы тела относительно первоначальной массы (7 из 14 мышей). Интересно, что мутантные мыши с инфекцией, получавшие антибиотики в сочетании с L-фукозой (12 из 12 мышей), а также мыши дикого типа (10 из 10 мышей), не демонстрировали такого сильного ухудшения состояния и восстанавливались к концу эксперимента (Рисунки 12Б и 12В). Мыши *Muc2<sup>-/-</sup>* без инфекций также демонстрировали снижение массы тела во время приема антибиотиков, но полностью восстанавливались к концу эксперимента (13 из 13 мышей, Рисунки 12Д и 12Г).

**Антибиотики вызывали разнонаправленное изменение бактериальной микрофлоры *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей с инфекцией и без нее, а L-фукоза не влияла на состав бактериальной микрофлоры**

Далее был исследован состав бактериальной микрофлоры мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* при ее обеднении антибиотиками. Метагеномный анализ микрофлоры показал, что реакция бактериальной микрофлоры на предоставление антибиотиков различалась у мышей с инфекцией и без нее. У мышей *Muc2<sup>-/-</sup>*, свободных от инфекции, под действием антибиотиков разнообразие микрофлоры снижалось, при этом начинали преобладать *Proteobacteria*. У *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей с инфекцией, разнообразие микрофлоры, наоборот, увеличивалось. Начинали детектироваться различные минорные таксоны (Рисунок 13).

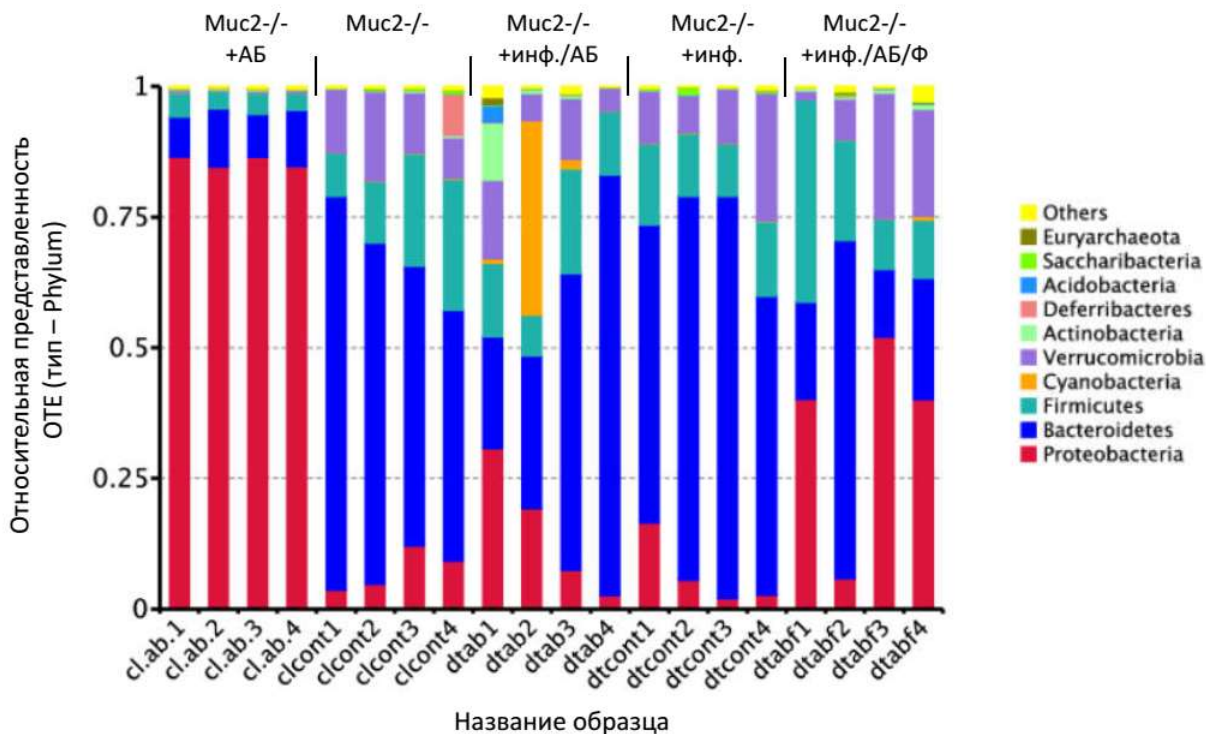


Рисунок 13. Результат метагеномного исследования микрофлоры мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* с инфекцией и без нее, до и после приема антибиотиков. Относительная представленность операционных таксономических единиц (ОТЕ – Phylum).

Однако микрофлора мутантных мышей с инфекцией, получавших L-фукозу с антибиотиками, не отличалась по разнообразию от группы, получавшей лишь антибиотики. Таким образом, восстановление мутантных мышей при добавлении к антибиотикам L-фукозы не было связано с восстановлением бактериальной микрофлоры.

### Л-фукоза регулировала колонизацию *Tritrichomonas* sp. на фоне обеднения бактериальной микрофлоры кишечника у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей

Поскольку в предыдущих экспериментах истощение мышей было ассоциировано с *Tritrichomonas* sp., было проанализировано присутствие этого микроорганизма при воздействии антибиотиков и L-фукозы. На 8й день эксперимента, после введения антибиотиков внутривентрикулярно, наблюдалось снижение количества *Tritrichomonas* sp. При этом изменение способа предоставления антибиотиков способствовало разрастанию этого микроорганизма. Интересно, что добавление L-фукозы отменяло данный эффект (Рисунок 14А).

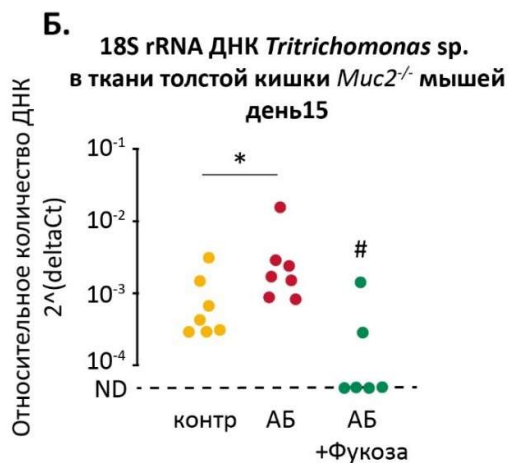
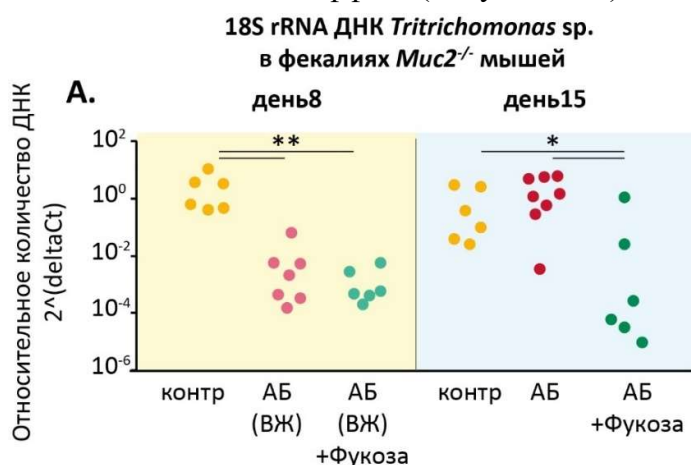


Рисунок 14. Количество ДНК 18S rRNA *Tritrichomonas* sp. в фекалиях и ткани толстой кишки мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> после приема антибиотиков и L-фукозы. АБ(ВЖ) – антибиотики вводили внутривентрикулярно; АБ – антибиотики добавляли в питьевую воду. А. Количество ДНК *Tritrichomonas* sp. в фекалиях на 8й и 15й дни эксперимента (относительно ДНК 28S rRNA мыши). \*, \*\* -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test. Б. Количество ДНК 18S rRNA *Tritrichomonas* spp в ткани толстой кишки на 15й день эксперимента (относительно ДНК 28S rRNA мыши). \* -  $p < 0,05$  Mann-Whitney U-test; # -  $p < 0,05$  Fisher exact test

Более того, было обнаружено, что у мышей, получавших антибиотики, увеличивалось количество ДНК *Tritrichomonas* sp. и в ткани толстой кишки по сравнению с мышами контрольной группы, а добавление L-фукозы нивелировало этот эффект (Рисунок 14Б). Таким образом, истощение *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей, рожденный с инфекцией, было ассоциировано с разрастанием микроорганизмов *Tritrichomonas* sp. в кишечнике, которое сдерживалось добавлением к антибиотикам L-фукозы.

#### **L-фукоза корригировала эффекты антибиотиков на биохимические и иммунные показатели мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> с инфекцией**

Разрастание *Tritrichomonas* sp. на фоне обеднения бактериальной микрофлоры и нарушенной барьерной функции в кишечнике могло приводить к повышению токсического воздействия на организм. У *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей были исследованы внутриклеточные ферменты аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспаратаминотрансфераза (АСТ), а также количество лактата в крови. Повышение АСТ и АЛТ может говорить об обширной гибели клеток внутренних органов, в том числе, печени (Evans *et al.*, 2009), а повышение уровня лактата является маркером сепсиса (Faix *et al.*, 2013).

Обеднение микрофлоры способствовало повышению концентрации АЛТ крови у *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей независимо от присутствия инфекции (Рисунок 15А и 15В). Однако, концентрация АСТ увеличивалась только у мутантных мышей с инфекцией. Интересно, что добавление к антибиотикам L-фукозы нивелировало повышение АСТ (Рисунок 15А). Таким образом, изменение уровня АСТ в крови у мышей сочеталось с разрастанием *Tritrichomonas* sp. на фоне нарушения бактериальной микрофлоры. На количество лактата в крови обеднение микрофлоры не оказывало эффект ни в одной группе (Рисунок 15Б и 15Г).



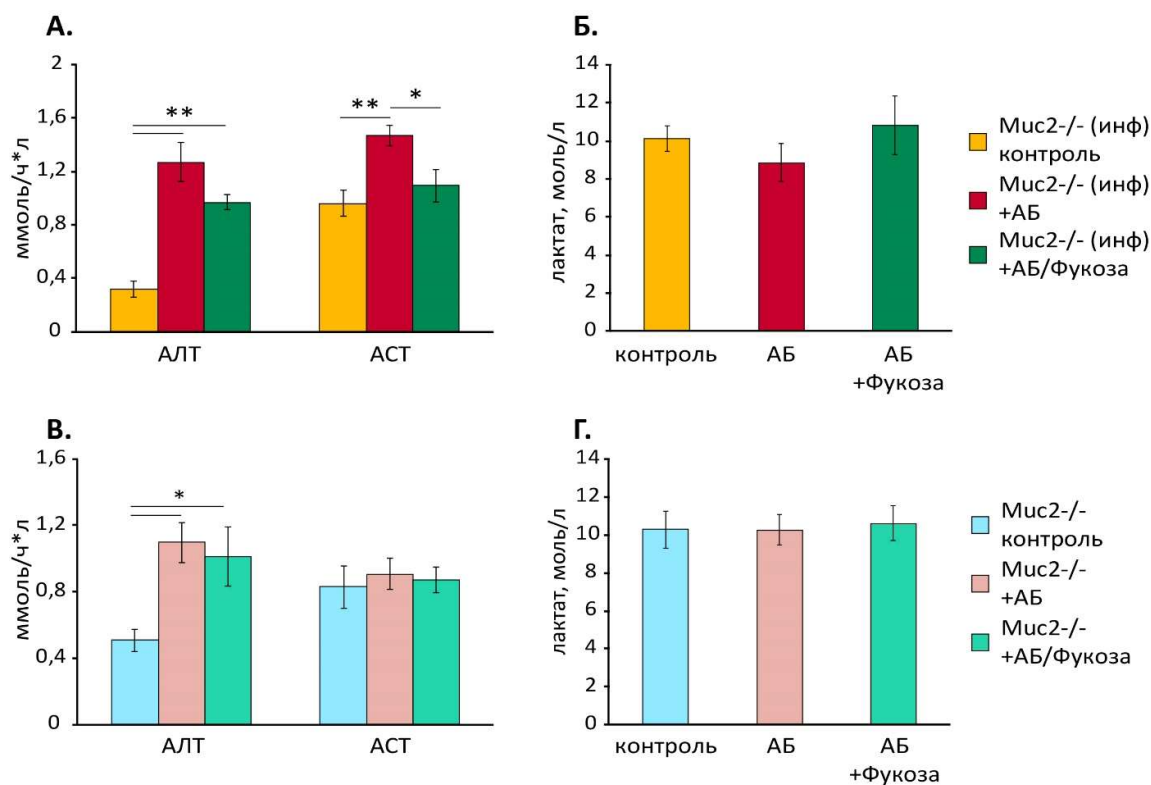


Рисунок 15. Количество АЛТ, АСТ и лактата в крови у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> с инфекцией и без нее, после воздействия антибиотиков и L-фукозы. А. Количество АЛТ и АСТ у мышей с инфекциями. Б. Количество лактата у мышей с инфекциями. В. Количество АЛТ и АСТ у мышей без инфекций. Г. Количество лактата у мышей без инфекций. Количество мышей в группе для АЛТ и АСТ:  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}) = 8$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}) = 6$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}/\Phi) = 6$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 8$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}) = 6$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-АБ}/\Phi) = 5$ ; для лактата:  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}) = 8$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}/\Phi) = 5$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 6$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-АБ}/\Phi) = 7$ . \*, \*\* -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test

Нарушение микрофлоры и разрастание *Tritrichomonas* sp. может приводить к провоспалительным реакциям, поэтому мы оценили количество провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  в ткани толстой кишки у мышей, а также состояние мезентериальных лимфатических узлов (ЛУ). Обеднение микрофлоры приводило к увеличению количества IL-1 $\beta$  в ткани толстой кишки мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> независимо от присутствия инфекций. L-фукоза нивелировала увеличение данного цитокина только у мышей с инфекцией *Tritrichomonas* sp. (Рисунок 16).

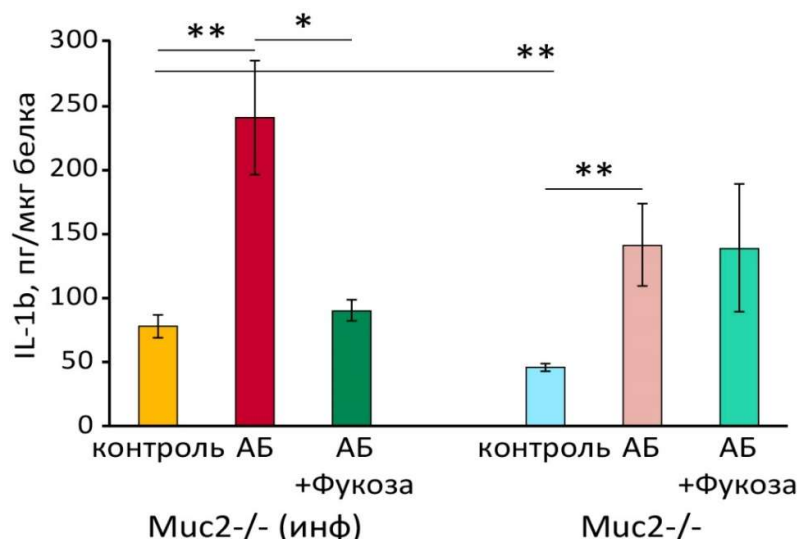


Рисунок 16. Количество IL-1 $\beta$  в ткани толстой кишки у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* после воздействия антибиотиков и L-фукозы. Количество мышей в группе:  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}) = 6$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}/\Phi) = 6$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}) = 6$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-АБ}/\Phi) = 5$ . \*, \*\* -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test

При исследовании иммунного статуса *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей мы обнаружили увеличение процента регуляторных Т-клеток ( $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ ) в мезентериальных ЛУ у мышей с инфекциями по сравнению с мышами без инфекций. Регуляторные Т-клетки могут играть важную роль в регуляции воспаления в кишечнике мышей с нарушенной барьерной функцией, особенно при наличии инфекций.

Нарушение кишечной микрофлоры антибиотиками приводило к снижению процентного состава данной субпопуляции у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей независимо от присутствия инфекции. Эти изменения, по-видимому, происходили за счет снижения экспрессии белка Foxp3 (Рисунок 17А и 17Б). При этом добавление L-фукозы не влияло на этот эффект, вероятно, угнетение регуляторной функции происходило из-за обеднения бактериальной микрофлоры, и протозойная инфекция не влияла на этот процесс.

Обеднение микрофлоры приводило к снижению клеточности мезентериальных ЛУ (Рисунок 17В и 17Г). Аналогичное влияние было выявлено и на количество регуляторных Т-клеток  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$  (Рисунок 17Д и 17Е). При этом добавление L-фукозы отменяло снижение клеточности и регуляторных Т-клеток у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей с инфекциями (Рисунок 17В и 17Е). Вероятно, нарушение микрофлоры приводило к угнетению иммунной системы, а протозойная инфекция усугубляла этот эффект.

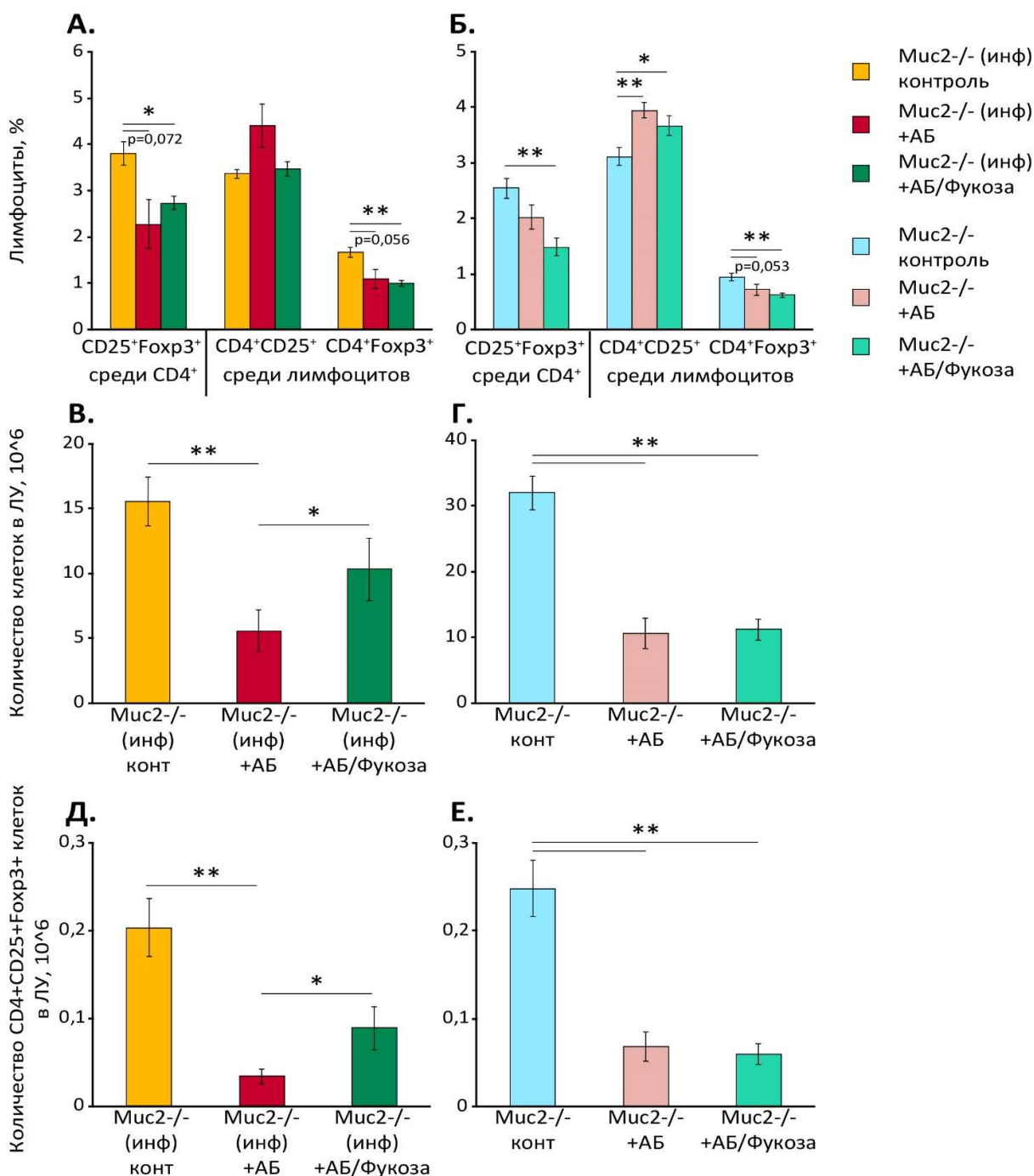


Рисунок 17. Регуляторные Т-клетки мезентериальных ЛУ мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> после воздействия антибиотиков и L-фукозы. А. Процентный состав субпопуляций лимфоцитов у мышей с инфекциями. Б. Процентный состав субпопуляций лимфоцитов у мышей свободных от инфекций. В. Количество клеток в ЛУ у мышей с инфекциями. Г. Количество клеток в ЛУ у мышей без инфекций. Д. Количество регуляторных Т-клеток в ЛУ мышей с инфекциями. Е. Количество регуляторных Т-клеток в ЛУ мышей без инфекций. Количество мышей в группе:  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{инф}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{инф}+\text{АБ}) = 8$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{инф}+\text{АБ}/\Phi) = 5$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 6$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}/\Phi) = 6$ . \*, \*\* -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test

**Обеднение бактериальной микрофлоры приводило к изменению иммунного статуса мышей**

Обеднение микрофлоры антибиотиками может приводить к лейкопении, обусловленной снижением дифференцировки лейкоцитов в красном костном мозге вследствие недостатка сигналов от кишечной микрофлоры (Josefsdottir et al., 2017). Мы исследовали влияние нарушения бактериальной микрофлоры кишечника на иммунный статус мышей с дефицитом муцина2.

Обеднение микрофлоры антибиотиками приводило к снижению клеточности тимуса (Рисунок 18) и селезенки (Рисунок 19А), уменьшению общего количества лейкоцитов, а также различных субпопуляций лимфоцитов в крови у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* (Рисунок 20А). Помимо этого, нарушение микрофлоры вызывало увеличение процента Т-клеток в селезенке (CD3<sup>+</sup>) и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенке и крови (Рисунки 19Б и 20Б). При этом данный эффект наблюдался у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей независимо от присутствия инфекций. Таким образом, при нарушении микрофлоры антибиотиками наблюдалось угнетение иммунной системы, затрагивающее различные органы. Полученные результаты согласуются с полученными ранее данными об угнетении красного костного мозга (Josefsdottir et al., 2017) и указывают на важную роль бактериальной микрофлоры в функционировании иммунной системы.

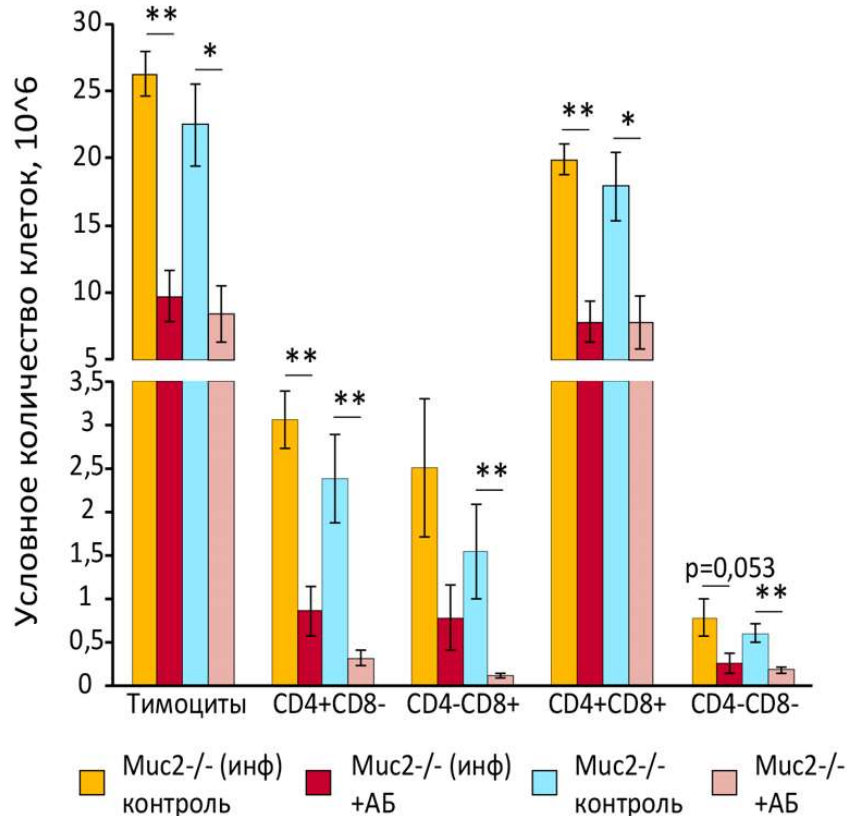


Рисунок 18. Влияние антибиотиков на количество тимоцитов у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей. Количество мышей в группе:  $n(Muc2^{-/-} \text{ инф}) = 7$ ;  $n(Muc2^{-/-} \text{ инф} + \text{АБ}) = 6$ ;  $n(Muc2^{-/-}) = 5$ ;  $n(Muc2^{-/-} + \text{АБ}) = 7$ . \*, \*\* -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test

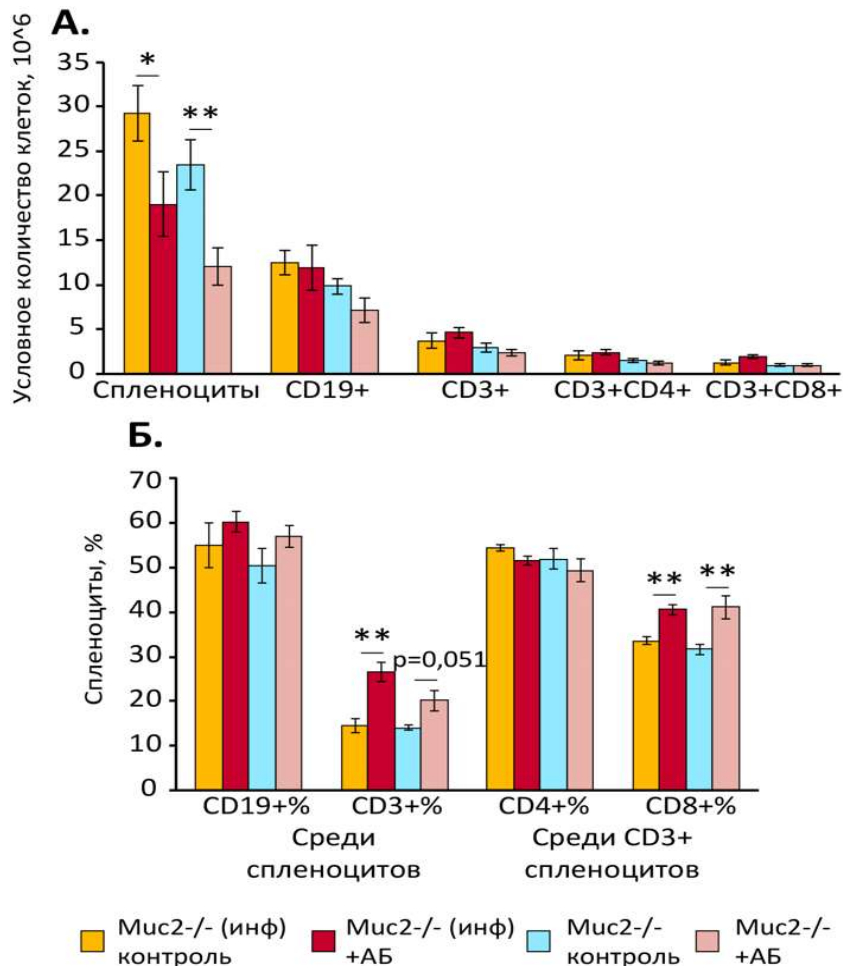


Рисунок 19. Влияние антибиотиков на спленоциты у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей. А. Условное количество спленоцитов. Б. Процентное содержание субпопуляций спленоцитов. Количество животных в группе для «спленоциты» на рисунке А:  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}) = 9$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}) = 7$ . Количество мышей в группе для «CD19+ - CD3+CD8+» на рисунке А и рисунка Б:  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}) = 5$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 5$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-АБ}) = 7$ . \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test

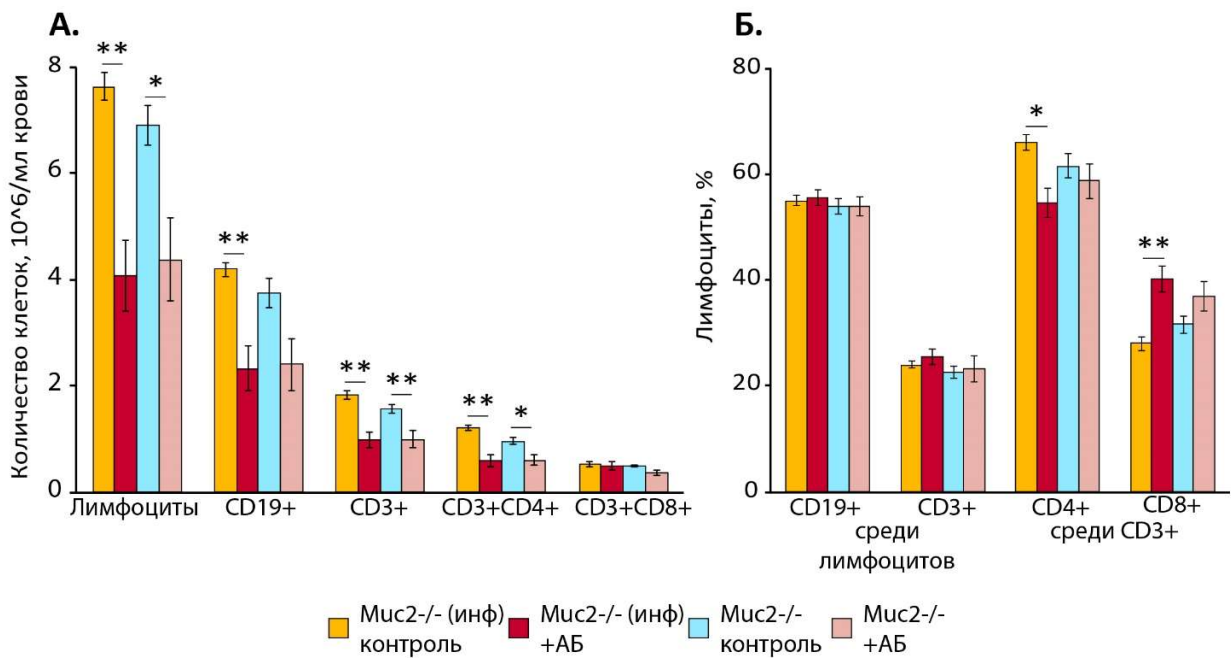


Рисунок 20. Лимфоциты в крови у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей после воздействия антибиотиков. А. Количество лимфоцитов в крови у мышей. Б. Процентное содержание лимфоцитов в крови у мышей. Количество мышей в группе:  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}) = 7$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 5$ ;  $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}) = 6$ . \*, \*\* -  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test

## ВЫВОДЫ

1. Гликопротеин муцин2 способствует поддержанию барьерной функции кишечника и защищает от развития воспаления. У мышей с генетически обусловленным дефицитом муцина2 (*Muc2<sup>-/-</sup>*) в кишечнике развивается хроническое воспаление, активируются механизмы восстановления ткани (увеличение экспрессии *Tff3*, *Nos2*).
2. Муцин2 влияет на видовой состав микрофлоры кишечника, снижая колонизацию простейшим *Tritrichomonas* sp.
3. Симбиотическая бактериальная микрофлора кишечника играет важную роль в защите от цитотоксического воздействия протозойной инфекции *Tritrichomonas* sp. в условиях нарушенной барьерной функции.
4. Симбиотическая бактериальная микрофлора кишечника влияет на иммунную систему на местном и системном уровнях. Обеднение бактериальной микрофлоры приводит к снижению общего количества лимфоцитов и регуляторных Т-клеток в мезентериальных лимфатических узлах и активации провоспалительного ответа в кишечнике (повышение IL-1 $\beta$ ). Помимо этого, при обеднении микрофлоры наблюдается лейкопения, снижение клеточности тимуса и селезенки, а также перераспределение баланса CD4/CD8 в сторону CD8<sup>+</sup> Т-клеток.
5. Компонент муцина2 моносахарид L-фукоза угнетает простейшее *Tritrichomonas* sp. в кишечнике у *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей на фоне обеднения бактериальной микрофлоры. Механизмы влияния фукозы на колонизацию кишечника *Tritrichomonas* sp. не были установлены, но дальнейшие исследования в данной области могут способствовать разработке новых методов элиминации инфекции *Tritrichomonas* sp.
6. Прямое влияние L-фукозы на иммунную систему выявлено не было. L-фукоза корректировала изменение физиологических показателей (повышение IL-1 $\beta$  в кишечнике и АСТ в крови, снижение клеточности мезентериальных лимфоузлов), вызванное обеднением бактериальной микрофлоры у мышей с инфекцией *Tritrichomonas* sp. Однако, моносахарид не оказывал эффекта на исследованные показатели у мышей без инфекции. Таким образом, действие L-фукозы, вероятно, было обусловлено угнетением простейшего.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. **Achasova KM**, Kozhevnikova EN, Borisova MA, Litvinova EA. Fucose Ameliorates Trichomonas sp.-Associated Illness in Antibiotic-Treated Muc2<sup>-/-</sup> Mice // International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(19), 10699. doi: 10.3390/IJMS221910699
2. **Achasova KM**, Gvozdeva OV, Kozhevnikova EN, Litvinova EA Lymph node regulatory T-cell in Muc2<sup>-/-</sup> mice with Helicobacter spp // Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, 23(4), 629-634. doi: 10.15789/1563-0625-LNR-2268
3. Litvinova EA, Bets VD, Feofanova NA, Gvozdeva OV, **Achasova KM**, Alperina E, Kozhevnikova EN. Dietary fucose affects macrophage polarization and reproductive performance in mice // Nutrients, 2021; 13, 855. doi: /10.3390/nu13030855
4. Borisova MA, **Achasova KM**, Morozova KN, Andreyeva EN, Litvinova EA, Ogienko AA, Morozova MV, Berkaeva M, Kiseleva K, Kozhevnikova EN. Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium // Scientific Reports, 2020; 10:21135. doi: 10.1038/s41598-020-78141-4
5. Borisova MA, Snytnikova OA, Litvinova EA, **Achasova KM**, Babochkina TI, Pindyurin AV, Tsentulovich YP, Kozhevnikova EN. Fucose Ameliorates Tryptophan Metabolism and Behavioral Abnormalities in a Mouse Model of Chronic Colitis // Nutrients, 2020; 12(2). pii: E445. doi: 10.3390/nu12020445.
6. **Ачасова К.М.**, Литвинова Е.А. Мыши с нокаутом гена muc2 – модель для оценки способов воздействия на микрофлору кишечника // Российский Иммунологический Журнал, 2019. 13(22) №2: 713-715. doi: 10.31857/S102872210006753-3
7. Литвинова Е.А., **Ачасова К.М.** Экспериментальная модель для изучения механизма независимой от лимфоцитов поляризации макрофагов в кишечнике мышей // Российский Иммунологический Журнал, 2019. 13(22) №2: 852-854. doi: 10.31857/S102872210006651-1
8. Litvinova E.A., Kozhevnikova E.N., **Achasova K.M.**, Kontsevaya G.V., Moshkin M.P. Eradication of Helicobacter spp. in mucin2 deficient mice // Laboratory Animals, 2017. 51(3):311-314. doi: 10.1177/0023677216670687
9. Литвинова Е.А., **Ачасова К.М.**, Борисова М.А., Женило С.В., Прохорчук Е.Б., Кожевникова Е.Н. Роль гена Kaiso в развитии воспаления у мышей с дефицитом Муцина-2 // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2018. 22(8): 1078-10831. doi: 10.18699/VJ18.453.
10. **Achasova K.**, Litvinova E. Intestinal macrophages function polarization by monosaccharides in mice lacking mucin2 // Cytokine. Special issue: 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (ICIS), Kanazawa, Japan, 2017. 100: 157. doi: 10.1016/j.cyto.2017.09.011



11. Litvinova E., **Achasova K.**, Kozhevnikova E., Zolotykh M., Moshkin M. The role of Mucin-2 and its monosaccharides in regulation of mucosal immunity // Cytokine. Special issue: 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (ICIS), Kanazawa, Japan, 2017. 100: 65-66. doi: 10.1016/j.cyto.2017.09.010

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

FELASA – the Federation of European Laboratory Animal Science Associations

SSCP - Single-strand conformational polymorphism

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛУ – лимфатические узлы

ПЦР – полимеразная цепная реакция