

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

АЧАСОВА КСЕНИЯ МИХАЙЛОВНА

**Роль гликопротеина муцина² и его структурного компонента
фукозы в регуляции барьерной функции кишечника.**

03.03.01 - физиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

Литвинова Екатерина Анатольевна

Новосибирск

2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Роль микрофлоры в поддержании гомеостаза в кишечнике	13
1.1.1. Кишечный барьер во взаимоотношениях организма хозяина с микрофлорой.	13
1.1.2. Роль микрофлоры в формировании про- и противовоспалительных реакций иммунной системы и защите от патогенов	17
1.1.3. Факторы, влияющие на состав кишечной микрофлоры.....	19
1.2. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК)	21
1.2.1. Нарушение эпителиального барьера в кишечнике при ВЗК.....	22
1.2.2. Нарушение иммунной функции в кишечнике при ВЗК	24
1.2.3. Нарушение микрофлоры в кишечнике при ВЗК	27
1.2.4. Экспериментальные модели ВЗК на лабораторных животных	30
2.1. Животные и условия содержания	32
2.2. Получение мышей <i>Muc2^{-/-}</i> и <i>Muc2^{+/+}</i> , рожденных с инфекциями <i>Helicobacter</i> spp. и <i>Tritrichomonas</i> sp.....	33
2.3. Эксперимент №1. Исследование влияния дефицита муцина2 на иммунный статус мышей	34
2.4. Эксперимент №2. Воздействие на микрофлору <i>Muc2^{-/-}</i> и C57BL/6 мышей антибиотиками и L-фукозой.....	34
2.5. Эксперимент №3. Воздействие антибиотиками на микрофлору свободных от инфекций мышей	35
2.6. Эксперимент №4. Исследование микрофлоры и иммунного статуса <i>Muc2^{-/-}</i> и <i>Muc2^{+/+}</i> мышей, рожденных с инфекциями и без	35
2.7. Эксперимент №5. Воздействие высокой дозой антибиотиков на микрофлору <i>Muc2^{-/-}</i> мышей с инфекциями	36
2.8. Эксперимент №6. Воздействие антибиотиками и L-фукозой на микрофлору мышей с инфекциями и без	36
2.9. Эксперимент №7. Исследование влияния обеднения микрофлоры на иммунный статус мышей с инфекциями и без	37
2.10. Гистологический анализ срезов толстой кишки	38
2.11. Анализ экспрессии генов в ткани толстой кишки	38
2.11.1. Выделение РНК из ткани толстой кишки, подготовка образцов РНК.....	38

2.11.2. Реакция обратной транскрипции и количественная ПЦР в реальном времени	38
2.12. Выделение ДНК из фекалий и содержимого кишечника.....	39
2.13. Определение бактериальной ДНК в фекалиях методом количественной ПЦР в реальном времени.....	40
2.14. Оценка разнообразия бактериальной микрофлоры методом одноцепочечного конформационного полиморфизма (Single-strand conformation polymorphism – SSCP) гена 16S rRNA.....	40
2.15. Метагеномный анализ бактериальной микрофлоры кишечника мышей.....	41
2.17. Определение ДНК обнаруженного <i>Tritrichomonas</i> sp. в фекалиях методом количественной ПЦР в реальном времени	43
2.18. Определение генотипа мышей, полученных от скрещивания <i>Muc2^{+/-}</i>	44
2.19. Определение количества IgA в толстой кишке методом иммуноферментного анализа (ИФА)	44
2.20. Определение количества IgG в крови против собственной микрофлоры и количества IgG в толстой кишке методом ИФА	45
2.21. Определение IgG и IgA в крови методом ИФА	46
2.22. Анализ лимфоцитов в крови методом проточной цитофлуориметрии	47
2.23. Анализ клеток селезенки методом проточной цитофлуориметрии	47
2.23.1. Подготовка суспензии спленоцитов	47
2.23.2. Анализ спленоцитов по маркерам CD19, CD3, CD4, CD8	48
2.23.3. Определение условного количества клеток (УКК) селезенки.....	48
2.24. Анализ клеток тимуса методом проточной цитофлуориметрии	49
2.25. Анализ лимфоцитов в мезентериальных лимфатических узлах методом проточной цитофлуориметрии.....	49
2.25.1. Подготовка суспензии лимфоцитов	49
2.25.2. Анализ лимфоцитов по маркерам CD4, CD25, Foxp3	50
2.25.3. Анализ лимфоцитов по маркерам CD19, CD3, CD4, CD8.....	50
2.26. Анализ количества IL-1 β в ткани толстой кишки методом ИФА	51
2.27. Определение количества фукозы в толстой кишке	51
2.28. Определение проницаемости кишечника	52
2.29. Определение количества лактата, аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в крови.....	52
2.30. Статистическая обработка результатов	52

Глава 3. Результаты	54
3.1. Влияние дефицита муцина2 на иммунный статус мышей (Эксперимент №1) ...	54
3.1.1. В ткани толстой кишки у мышей <i>Muc2^{-/-}</i> выявлены признаки хронического воспаления	54
3.1.2. В ткани толстой кишки <i>Muc2^{-/-}</i> мышей увеличена экспрессия факторов воспаления	55
3.1.3. В крови у мышей <i>Muc2^{-/-}</i> мышей повышен уровень IgG против собственной микрофлоры.....	57
3.1.4. В толстой кишке у <i>Muc2^{-/-}</i> мышей снижено количество связанной с белком фукозы	58
3.2. Влияние антибиотиков и L-фукозы на микрофлору мышей <i>Muc2^{-/-}</i> и C57BL/6 (Эксперимент №2).....	59
3.2.1. Прием антибиотиков вызывал истощение и гибель <i>Muc2^{-/-}</i> мышей	59
3.2.2. Прием антибиотиков приводил к обеднению бактериальной микрофлоры кишечника мышей.....	61
3.2.3. В кишечнике <i>Muc2^{-/-}</i> мышей был обнаружен микроорганизм <i>Tritrichomonas</i> sp.	64
3.3. Влияние антибиотиков на микрофлору <i>Muc2^{-/-}</i> мышей, свободных от инфекций (Эксперимент №3).....	67
3.3.1. Мыши <i>Muc2^{-/-}</i> , свободные от инфекций, не погибали от антибиотиков	67
3.3.2. Антибиотики обедняли бактериальную микрофлору кишечника мышей, свободных от инфекций	67
3.4. Влияние врожденной инфекции на иммунный статус мышей <i>Muc2^{-/-}</i> и <i>Muc2^{+/+}</i> (Эксперимент №4).....	68
3.4.1. Получение мышей от гетерозиготного скрещивания способствовало выравниванию микрофлоры <i>Muc2^{-/-}</i> и <i>Muc2^{+/+}</i> мышей.....	68
3.4.2. У мышей <i>Muc2^{-/-}</i> мышей, рожденных с инфекциями и без, повышена проницаемость кишечника.....	69
3.4.3. Мыши с нормальной барьерной функцией (<i>Muc2^{+/+}</i>) оказались устойчивы к колонизации <i>Tritrichomonas</i> sp.	70
3.4.4. Инфекции влияли на регуляторные Т-клетки в мезентериальных лимфатических узлах (ЛУ) у <i>Muc2^{-/-}</i> мышей.....	71
3.4.5. Присутствие инфекций было ассоциировано с увеличением CD4 ⁺ Т-клеток в крови <i>Muc2^{-/-}</i> мышей	72
3.4.6. Отсутствие муцина2 и присутствие инфекций влияли на количество иммуноглобулинов в крови мышей	73

3.5. Элиминация <i>Tritrichomonas</i> sp. способствовала выживанию <i>Muc2^{-/-}</i> мышей при обеднении бактериальной микрофлоры (Эксперимент №5)	73
3.6. Влияние антибиотиков и L-фукозы на микрофлору <i>Muc2^{-/-}</i> и <i>Muc2^{+/+}</i> мышей с инфекциями и без (Эксперимент №6)	75
3.6.1. L-фукоза способствовала восстановлению массы тела <i>Muc2^{-/-}</i> мышей с инфекциями при приеме антибиотиков	75
3.6.2. Анализ микрофлоры кишечника мышей <i>Muc2^{-/-}</i> при приеме антибиотиков и L-фукозы	77
3.6.3. Прием антибиотиков и L-фукозы влиял на количество внутриклеточных ферментов в крови <i>Muc2^{-/-}</i> мышей.....	82
3.6.4. Прием антибиотиков приводил к повышению IL-1 β в ткани толстой кишки <i>Muc2^{-/-}</i> мышей, а L-фукоза нивелировала этот эффект у мышей с инфекциями.....	84
3.6.5. Прием антибиотиков приводил к снижению клеточности и регуляторных T-клеток в мезентериальных ЛУ <i>Muc2^{-/-}</i> мышей	85
3.7. Влияние обеднения микрофлоры на иммунный статус мышей <i>Muc2^{-/-}</i> с инфекциями и без	88
3.7.1. Обеднение микрофлоры приводило к количественному снижению субпопуляций и перераспределению CD4/CD8 лимфоцитов в крови.....	88
3.7.2. Обеднение микрофлоры приводило к снижению клеточности тимуса.....	89
3.7.3. Обеднение микрофлоры приводило к снижению клеточности селезенки и увеличению процентного содержания CD3 ⁺ и CD3 ⁺ CD8 ⁺ спленоцитов.....	91
Глава 4. Обсуждение результатов	93
4.1. Влияние дефицита муцина2 на иммунный статус мышей.....	93
4.2. Обеднение кишечной микрофлоры и снижение жизнеспособности <i>Muc2^{-/-}</i> мышей с инфекциями.....	97
4.3. Влияние инфекций на иммунный статус мышей <i>Muc2^{-/-}</i>	99
4.4. Влияние L-фукозы на колонизацию кишечника <i>Tritrichomonas</i> sp. и жизнеспособность <i>Muc2^{-/-}</i> мышей на фоне обеднения кишечной микрофлоры	102
4.5. Влияние L-фукозы и антибиотиков на бактериальную микрофлору кишечника <i>Muc2^{-/-}</i> мышей.....	104
4.6. Влияние L-фукозы на иммунный статус мышей <i>Muc2^{-/-}</i> при обеднении бактериальной микрофлоры	106
4.7. Прикладная значимость полученных результатов	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ВЫВОДЫ	115

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	117
ПРИЛОЖЕНИЯ	144
Приложение №1. Последовательности праймерных олигонуклеотидов	144
Приложение №2. <i>Tritrichomonas</i> sp. и последовательности для филогенетического анализа	145
Приложение №3. Схема анализа лимфоцитов в крови	146
Приложение №5. Схема анализа тимоцитов	148
Приложение №6. Схема анализа лимфоцитов мезентериальных ЛУ	149
Приложение №7. Количество клеток различных субпопуляций в мезентериальных ЛУ у контрольных мышей <i>Muc2^{-/-}</i> и <i>Muc2^{+/+}</i>	150
Приложение №8. Анализ представленности некоторых ОТЕ (Phylum) в образцах фекалий мышей <i>Muc2^{-/-}</i> с инфекциями и без них	151
Приложение №9. Концентрация АЛТ и АСТ в крови у <i>Muc2^{+/+}</i> мышей до и после приема антибиотиков	152
Приложение №10. Лимфоциты в крови у <i>Muc2^{+/+}</i> мышей до и после приема антибиотиков	152
Приложение №11. Тимоциты мышей <i>Muc2^{+/+}</i> до и после приема антибиотиков	153
Приложение №12. Спленоциты мышей <i>Muc2^{+/+}</i> до и после приема антибиотиков	154
Приложение №13. Количество бактериальной ДНК у мышей <i>Muc2^{-/-}</i> после антибиотиков	155
Приложение №14. Количество ДНК <i>Tritrichomonas</i> sp. в толстой кишке у мышей <i>Muc2^{-/-}</i> после антибиотиков и L-фукозы	156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В кишечнике обитает огромное количество микроорганизмов, которые играют важную роль в физиологических процессах организма хозяина, а также обеспечивают защиту от колонизации патогенами (Gensollen et al., 2016; Pickard et al., 2017; Kamada et al., 2013). 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 патогенов (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^{-/-}*);
2. Определить роль бактериальной микрофлоры кишечника в изменении иммунного статуса мышей *Muc2^{-/-}*;
3. Установить роль моносахарида L-фукозы в регуляции микрофлоры кишечника у мышей *Muc2^{-/-}* на фоне приема антибиотиков.

Научная новизна работы. В данной работе показано, что у мышей вследствие генетически обусловленного дефицита муцина2 (мышь *Muc2^{-/-}*) происходит нарушение барьерной функции и развивается хроническое воспаление в кишечнике. Также дефицит муцина2 снижает устойчивость к колонизации кишечника мышей

микроорганизмом *Tritrichomonas* sp. Таким образом, гликопротеин муцина² участвует в регуляции иммунных реакций и микрофлоры в кишечнике.

Нарушение бактериальной кишечной микрофлоры приводит к истощению и гибели *Muc2*^{-/-} мышей с сопутствующей инфекцией *Tritrichomonas* sp. При этом элиминация *Tritrichomonas* sp. или наличие муцина² 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 муцина² 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*^{-/-} 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.

Апробация результатов. По теме диссертации опубликовано 11 статей в изданиях, рекомендованных ВАК, девять из них индексируются в SCOPUS и WOS. Результаты исследования были представлены на российских и международных конференциях в виде устных и постерных докладов.

Основные публикации:

1. **Achasova KM**, Kozhevnikova EN, Borisova MA, Litvinova EA. Fucose Ameliorates *Tritrichomonas* sp.-Associated Illness in Antibiotic-Treated Muc2^{-/-} 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^{-/-} 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, Tsentalovich 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. – С. 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. – С. 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). – P. 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). – С. 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. – P. 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. – P. 65-66. doi: 10.1016/j.cyto.2017.09.010

Личный вклад автора в работу. 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.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль микрофлоры в поддержании гомеостаза в кишечнике

Микробиоценоз (микрофлора) кишечника представляет собой сложное динамическое сообщество микроорганизмов, тесно взаимодействующих с организмом хозяина. Согласно современным данным, микрофлора кишечника человека представлена бактериями, археями, грибами и вирусами, и исчисляется несколькими триллионами микробов, а совокупность геномов этих микроорганизмов (микробиом) значительно превосходит геном человека по количеству генов (Lynch and Pedersen, 2016). Микрофлора кишечника находится с организмом хозяина в симбиотических отношениях, сформировавшихся в процессе длительной коэволюции. Микрофлора играет важную роль в физиологических процессах организма хозяина (пищеварение и обмен веществ, иммунные реакции), а также обеспечивает защиту от колонизации кишечника патогенными микроорганизмами (Gensollen et al., 2016; Kamada et al., 2013; Pickard et al., 2017). В свою очередь, среда в кишечнике, которая зависит как генетических особенностей и физиологических процессов в организме хозяина, так и от факторов внешней среды, питания, влияет на состав микрофлоры – способствует росту одних и подавляет другие микроорганизмы (Hasan and Yang, 2019). Бактерии в просвете кишечника постоянно стимулируют мукозальную иммунную систему, при этом могут активироваться как про- так и противовоспалительные иммунные реакции. Поэтому для поддержания гомеостаза важным является сохранение баланса между толерантностью к симбиотической микрофлоре и иммунными ответами на патогенные микроорганизмы (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010; Eberl, 2010). Важную роль в регуляции взаимоотношений с микрофлорой выполняет кишечный барьер, который включает в себя слой слизи (мукус), эпителиальные клетки и их межклеточные контакты, а также иммунные клетки в lamina propria (König et al., 2016).

1.1.1. Кишечный барьер во взаимоотношениях организма хозяина с микрофлорой

Эпителий кишечника является важным компонентом кишечного барьера, он представляет собой однослойный цилиндрический эпителий, смежные поверхности клеток соединяются между собой при помощи плотных и адгезивных межклеточных контактов. Такие контакты обуславливают избирательную проницаемость кишечного эпителия для воды, ионов и питательных веществ, а также предотвращают

проникновение микроорганизмов в подлежащую соединительную ткань. (Рисунок 1.1). (Maynard et al., 2012).

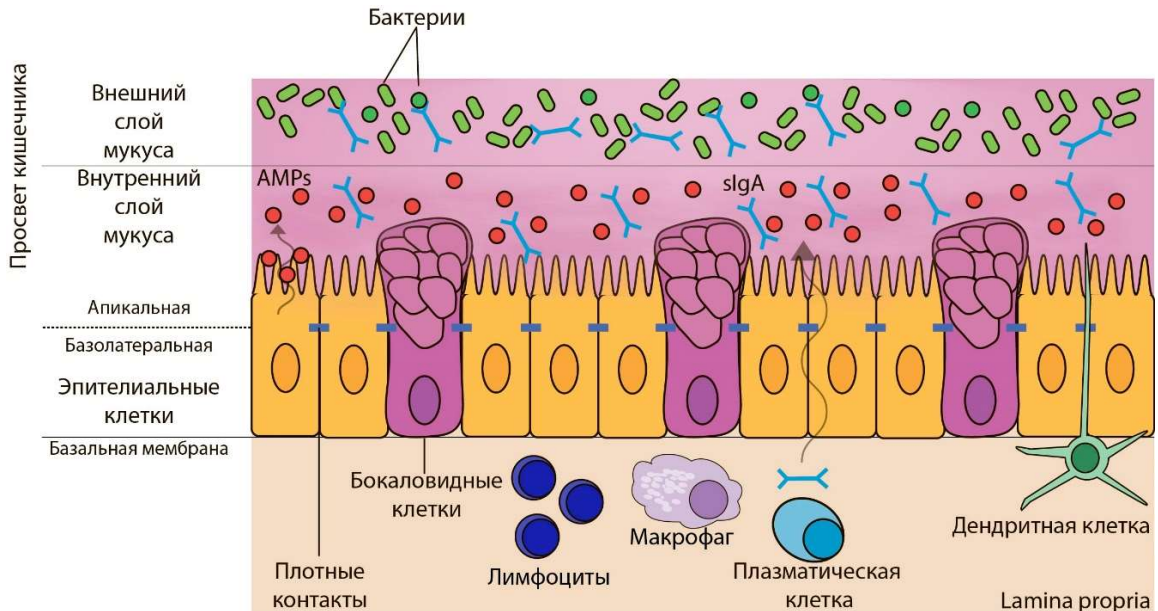


Рисунок 1.1 – Внутренняя поверхность кишечника выстлана однослойным цилиндрическим эпителием. Плотные и адгезивные контакты между клетками разделяют эпителий на апикальную и базолатеральную поверхности. Апикальная поверхность эпителия покрыта слоем мукуса, основой мукуса является гликопротеин муцин2, который секретируется бокаловидными клетками. В толстой кишке мукус представлен двумя слоями. Внешний слой более рыхлый и заселен бактериями. Внутренний слой более плотный и прикреплен к эпителиальным клеткам, практически непроницаем для бактерий из-за высокой концентрации в нем антимикробных пептидов (AMPs), выделяемых эпителиальными клетками, и секреторного IgA, выделяемого плазматическими клетками. Таким образом, кишечный барьер, представленный эпителием и слоем мукуса, предотвращает чрезмерный контакт иммунных клеток в lamina propria с микроорганизмами, обитающими в просвете кишечника.

Эпителий с апикальной стороны, обращенной в просвет кишечника, защищен гелеобразным слоем слизи (мукуса), основу которого составляет гликопротеин муцин2. Этот слой представляет собой физический барьер между эпителиоцитами и микрофлорой, обитающей в просвете. Муцин2, который составляет основу мукусного слоя, секретируется в просвет кишечника специализированными бокаловидными клетками эпителия (Maynard et al., 2012; Pelaseyed et al., 2014). Толщина слоя мукуса на протяжении кишечника различается. В проксимальном отделе тонкой кишки слой

мукуса тонкий и прерывающийся, в дистальном отделе тонкой кишки слой утолщается, а в толстой кишке его толщина наибольшая, и слой становится непрерывным (Johansson et al., 2011). Такое распределение мукуса связано с увеличением бактериальной нагрузки от тонкой кишки к толстой. В толстой кишке выделяют два слоя мукуса. Внутренний слой плотный, в норме практически непроницаемый для бактерий, прикреплен к апикальной поверхности эпителия и постоянно обновляется. Наружный слой мукуса более рыхлый, подвижный и обильно заселен бактериями, формируя для них среду обитания (Johansson et al., 2008) (Рисунок 1.1). Бактерии при помощи многочисленных ферментов отщепляют моносахариды от олигосахаридов и используют их в качестве источников энергии (Johansson et al., 2011). Таким образом, очень важная функция рыхлого слоя мукуса состоит в том, чтобы обеспечивать питательную среду для симбиотических бактерий кишечника. В отличие от внешнего слоя, внутренний слой мукуса практически непроницаем для бактерий, в нем скапливаются различные антимикробные пептиды. Таким образом, он формирует для эпителиальных клеток барьер, защищающий их от чрезмерного прямого контакта с бактериями (Pelaseyed et al., 2014) (Рисунок 1.1).

В свою очередь, кишечная микрофлора участвует в регуляции функции эпителиального барьера. Эпителиоциты экспрессируют ряд паттерн-распознающих рецепторов (patter-recognition receptors – PPRs), которые распознают микроб-ассоциированные молекулярные паттерны (microbe-associated molecular patterns - MAMPs) и патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns - PAMPs). К таким рецепторам относятся Toll-like рецепторы (TLRs) и NOD-подобные рецепторы (NLRs). Сигнальные каскады, активирующиеся микрофлорой через эти рецепторы, регулируют защитную функцию эпителия в кишечнике. Так, их активация может стимулировать наработку противомикробных белков (Kinnebrew et al., 2010; S et al., 2011; Vaishnava et al., 2008). Помимо этого было показано, что для эффективной пролиферации и восстановления эпителия в кишечнике у мышей после повреждения в результате воздействия декстран сульфата натрия (dextran sodium sulfate – DSS), необходимы сигналы от бактерий, которые воспринимаются TLR2 и TLR4 (Rakoff-Nahoum et al., 2004).

Кишечная микрофлора может влиять и на продукцию мукуса, а также плотность его слоя, от которой зависит проницаемость для бактерий (Jakobsson et al., 2015;

Petersson et al., 2011). Некоторые метаболиты кишечных бактерий (например, короткоцепочечные жирные кислоты – short-chain fatty acids – SCFA), выделяющиеся в результате метаболизма пищевых волокон, также влияют на барьерную функцию в кишечнике. Наиболее представленная в кишечнике короткоцепочечная жирная кислота бутират является энергетическим субстратом для эпителиальных клеток кишечника, оказывает влияние на метаболизм в клетках эпителия (Donohoe et al., 2011) и его барьерную функцию (Kelly et al., 2015).

Несмотря на то, что эпителиальные клетки кишечника защищены от прямого контакта с бактериями слоем мукуса, компоненты бактерий могут проникать во внутренний слой мукуса и взаимодействовать с PRRs на эпителиальных клетках. При этом эпителиальные клетки кишечника способны выделять ряд цитокинов и хемокинов с базолатеральной стороны, взаимодействуя при этом с иммунными клетками, находящимися в lamina propria (Maunard et al., 2012). Таким образом, ряд взаимодействий микрофлоры кишечника с иммунной системой происходит опосредованно эпителиальными клетками.

В просвете кишечника обитают как симбиотические и патогенные бактерии, но для поддержания гомеостаза в кишечнике, острые провоспалительные реакции должны развиваться в ответ на патогенную, но не на резидентную симбиотическую микрофлору. Иммунная система постоянно проводит мониторинг антигенов, присутствующих в просвете кишечника. Бактериальные антигены захватываются специальными М-клетками (характерны для тонкой кишки), которые предоставляют их специализированным антигенпрезентирующим клеткам, а также захват антигенов осуществляется и дендритными клетками (ДК) (Artis, 2008). ДК осуществляют процессинг антигенов и представляют их другим иммунным клеткам в lamina propria. На самих ДК также есть PRRs, активация которых запускает провоспалительные реакции. Благодаря своим свойствам и функциям, эти клетки являются важной составляющей защитного барьера кишечника. Однако при наличии такого постоянного мониторинга антигенов, в норме на антигены симбиотических бактерий не развиваются острые провоспалительные реакции. Известно, что в лимфоидной ткани кишечника находятся ДК, относящиеся к разным субпопуляциям и выполняющие разные функции. Так, ДК, несущие поверхностный маркер CD103 (CD103⁺), могут различными способами запускать дифференцировку регуляторных Foxp3⁺ Т-клеток и

секретирующих IgA плазматических клеток. Foxp3⁺ Т-клетки выделяют цитокины IL-10, TGF-β, которые оказывают супрессивное действие на другие иммунные клетки, обеспечивая таким образом толерантность иммунной системы к симбиотической микрофлоре. Пока остается не до конца понятным, каким образом CD103⁺-клетки приобретают свои толерогенные свойства. Считается, что предшественники CD103⁺-клеток приобретают свои свойства в кишечнике под воздействием определенных локальных факторов, к которым относят антигены некоторых симбиотических бактерий, пищевые компоненты (витамин А), факторы, выделяемые эпителиальными клетками и лейкоцитами (TGF-β, IL-10, ретиноевая кислота) (Aliberti, 2016; Coombes and Powrie, 2008; Scott et al., 2011).

Таким образом, эпителиальные клетки, слой мукуса и клетки иммунной системы формируют кишечный барьер – обеспечивают первичную защиту от проникновения патогенов и способствуют развитию толерантности организма хозяина к симбиотической микрофлоре.

1.1.2. Роль микрофлоры в формировании про- и противовоспалительных реакций иммунной системы и защите от патогенов

Микрофлора способствует поддержанию гомеостаза в кишечнике за счет модуляции функции иммунной системы организма хозяина и повышению устойчивости к патогенам. Микрофлора играет важную роль в формировании лимфоидной ткани кишечника, а также запуске противо- и провоспалительных реакций (Gensollen et al., 2016; Kamada et al., 2013).

Симбиотическая микрофлора оказывает значительное влияние на дифференцировку и функцию регуляторных Т-клеток, которые важны для поддержания гомеостаза в кишечнике (Barnes and Powrie, 2009). Показано, что у свободных от микробов (germ-free – GF) мышей регуляторные Т-клетки обладают более низкой супрессивной активностью, чем клетки конвенциональных мышей (Östman et al., 2006). Заселение кишечника GF-мышей коктейлем из симбиотических бактерий стимулировало дифференцировку регуляторных Т-клеток в lamina propria толстой кишки. При этом, такая стимуляция функции регуляторных Т-клеток способствовала становлению гомеостаза в кишечнике при заселении бактерий, а также

его поддержанию при нарушении эпителия декстраном сульфата натрия (DSS) (Geuking et al., 2011).

Помимо этого, есть данные о влиянии конкретных видов бактерий на регуляторные Т-клетки. Например, было показано, что полисахарид А (PSA), входящий в состав клеточной стенки широко распространенной бактерии *Bacteroides fragilis*, может стимулировать наработку противовоспалительного цитокина IL-10 CD4⁺-клетками, предотвращая развитие воспаления у мышей (Mazmanian et al., 2008). Заселение этой бактерией кишечника GF-мышей стимулирует дифференцировку CD4⁺Foxp3⁺ Т-клеток, продуцирующих IL-10, и эту стимуляцию опосредует сигналинг через TLR2 (Round and Mazmanian, 2010). Исследование с использованием бактерий из других таксономических групп показало, что заселение GF-мышей смесью бактерий, принадлежащих к кластерам IV и XIVa *Clostridium* spp., приводит к увеличению количества регуляторных Т-клеток в lamina propria толстой кишки. В данном исследовании было продемонстрировано, что стимуляция наработки IL-10 регуляторными Т-клетками при заселении *Clostridium* spp., вероятно, происходила вследствие увеличения продукции TGF- β эпителиальными клетками толстой кишки (Atarashi et al., 2011). На дифференцировку регуляторных Т-клеток могут влиять и метаболиты бактерий. Одним из таких метаболитов является короткоцепочечная жирная кислота бутират. Было показано, что бутират оказывает эффект на экспрессию гена транскрипционного фактора Foxp3 CD4⁺ Т-клетками в толстой кишке мышей, а также *in vitro*. При этом предоставление бутирата с пищей способствовало улучшению состояния мышей при индуцированном колите (Furusawa et al., 2013).

Некоторые симбиотические бактерии выполняют защитную функцию, оказывая противовоспалительное действие на иммунную систему хозяина. К таким бактериям относятся нитчатые сегментированные бактерии (segmented filamentous bacteria – SFB). Было показано, что заселение кишечника мышей этими бактериями стимулирует Th17-клетки (Т-хелперы 17 типа) (Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Ivanov et al., 2009). При этом животные, у которых в составе микрофлоры были такие бактерии, оказались устойчивыми к патогену *Citrobacter rodentium* (Ivanov et al., 2009). Таким образом, стимуляция иммунной системы нитчатыми сегментированными бактериями может выступать в роли защитного механизма организма хозяина от патогенов. Также бактерии-симбионты стимулируют наработку плазматическими клетками IgA, который

удерживает бактерии в просвете кишечника и предотвращает их взаимодействие с кишечным эпителием, а как следствие, и развитие сильных воспалительных реакций (Peterson et al., 2007).

Микрофлора выполняет защитную функцию не только путем стимуляции иммунной системы кишечника. Симбиотические бактерии способствуют наработке антимикробных пептидов, стимулируя TLRs на эпителиальных клетках кишечника, что может способствовать защите от патогенов (Vaishnava et al., 2008). Обеднение микрофлоры кишечника антибиотиками приводило к уменьшению количества антибактериального белка RegIII γ и заселению устойчивых к антибиотикам бактерий *Enterococcus* spp. При этом стимуляция бактериальным флагеллином (лиганд TLR5) способствовала увеличению количества RegIII γ и подавлению заселения *Enterococcus* spp. (Kinnebrew et al., 2010). Симбиотическая микрофлора также обеспечивает устойчивость к колонизации кишечника патогенами за счет конкуренции за пищевые ресурсы (Buffie and Pamer, 2013). Помимо этого, некоторые симбиотические бактерии, такие как *Bacteroides thetaiotaomicron*, в результате расщепления полисахаридов муцина² выделяют в просвет кишечника моносахарид фукозу, которая может подавлять экспрессию факторов вирулентности патогенной *Escherichia coli* (Pacheco et al., 2012). Другое исследование демонстрирует, что симбиотическая бактерия *Bifidobacterium longum* защищает мышей от интоксикации при заражении патогенным штаммом *E. coli* O157, вероятно, за счет продукции ацетата и влияния таким образом на эпителий в кишечнике (Fukuda et al., 2011; Fukuda et al., 2012).

Итак, симбиотическая микрофлора принимает участие в поддержании гомеостаза в кишечнике, важна для защиты от патогенов. В здоровом кишечнике взаимодействия бактерий с организмом хозяина очень точно сбалансированы, при этом состав микрофлоры зависит от среды в кишечнике.

1.1.3. Факторы, влияющие на состав кишечной микрофлоры

Заселение кишечника млекопитающих микроорганизмами происходит, в основном, во время рождения и в первые дни жизни. Первые годы жизни состав микрофлоры меняется в связи с изменением питания и под действием факторов окружающей среды. Сформированная в раннем онтогенезе микрофлора оказывает сильное влияние на дальнейшее функционирование организма в течение жизни. При

этом в течение жизни микрофлора также может меняться под воздействием различных эндогенных и экзогенных факторов (Houghteling and Walker, 2015).

Одним из важнейших факторов, обуславливающих состав и функционирование кишечной микрофлоры, является наличие полисахаридов в кишечнике. В основном полисахариды поступают в кишечник с пищей (пищевые волокна), при этом некоторые из них могут подвергаться гидролизу лишь при помощи ферментов кишечных бактерий. Бактерии расщепляют полисахариды на олиго- и моносахариды, при этом существует специализация бактерий по использованию тех или иных субстратов. Расщепляя данные вещества, бактерии с одной стороны используют их в качестве источников питательных веществ и энергии, а с другой – помогают организму хозяина получать энергию, а также выделяют метаболиты (например, короткоцепочечные жирные кислоты), модулирующие барьерную и иммунную функцию кишечника (Koropatkin et al., 2012). Таким образом, особенности потребляемой пищи обуславливают видовое разнообразие кишечной микрофлоры, а также преобладание тех или иных групп организмов.

Другим источником полисахаридов для бактерий является мукус в кишечнике. Основным компонентом мукуса – гликопротеин муцина2 имеет в своем составе большое количество полисахаридов. Некоторые бактерии могут расщеплять эти полисахариды и использовать в качестве источников энергии для себя, или выделять в среду для использования другими бактериями. Поэтому гликозилирование муцина2 очень важно для формирования и функционирования кишечной микрофлоры (Bergstrom and Xia, 2013; Koropatkin et al., 2012). Моносахарид фукоза входит в состав полисахаридов муцина2 и широко представлен в терминальном положении. Такое положение обеспечивает доступность данного моносахарида для бактерий в просвете кишечника, у некоторых бактерий есть ферменты для отщепления фукозы (Pickard and Chervonsky, 2015). В исследовании на мышах с мутацией в гене *Fut2*, кодирующем фермент галактозид-2-альфа-L-фукозилтрансфераза 2, было продемонстрировано, что генетически обусловленное нарушение фукозилирования муцина2 оказывало влияние на состав микрофлоры кишечника (Kashyap et al., 2013).

Таким образом, на формирование и поддержание сбалансированной кишечной микрофлоры оказывают влияние ряд факторов, которые зависят от генетического фона организма хозяина, а также окружающей среды. При этом, факторы среды могут

меняться в течение жизни. В то же время, правильно сформированная сбалансированная микрофлора необходима для поддержания гомеостаза в кишечнике, а нарушение гомеостаза может приводить к различным заболеваниям, например, воспалительным заболеваниям кишечника (ВЗК).

1.2. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК)

ВЗК – это идиопатические, рецидивирующие хронические воспалительные заболевания ЖКТ, в развитие которых вовлечены различные генетические, иммунологические и средовые факторы. К ВЗК относят такие заболевания, как болезнь Крона и язвенный колит. На сегодняшний день ВЗК являются серьезной проблемой в мировой медицине, их частота неизменно увеличивается. Наибольшее распространение ВЗК имеют в развитых западных странах, однако наблюдается их распространение и среди населения развивающихся стран (Ng et al., 2017). Несмотря на активное изучение ВЗК, их точная этиология до сих пор остается неясна. Согласно наиболее распространенной гипотезе патогенеза ВЗК, в результате взаимодействия факторов окружающей среды, иммунной системы хозяина и, часто, генетических факторов, развиваются сильные иммунные реакции и хроническое воспаление в кишечнике (Nishida et al., 2018). Многочисленные клинические исследования демонстрируют, что у пациентов, страдающих от ВЗК, наблюдаются нарушение барьерной функции в кишечнике (Antoni et al., 2014) и сильное, зачастую неконтролируемое, воспаление, вовлекающее различные компоненты иммунной системы (Lee et al., 2018; Xavier and Podolsky, 2007), а также серьезные изменения микрофлоры, приводящие к дисбиозу (Lane et al., 2017; Matsuoka and Kanai, 2015).

Пациенты с ВЗК страдают от рецидивирующего воспаления органов ЖКТ. Язвенный колит поражает в основном толстую и прямую кишку, характеризуется острым и хроническим воспалением слизистой оболочки кишки, сопровождается изъязвлениями и кровоизлияниями. Болезнь Крона может поражать любую часть ЖКТ и характеризуется трансмуральным воспалением, часто приводящим к формированию фистул (Hendrickson et al., 2002). При этом, из-за своего агрессивного влияния на иммунную систему, а также из-за методов лечения, супрессирующих иммунную функцию, наличие ВЗК является фактором риска развития рака органов ЖКТ, особенно, рака толстой и прямой кишки (Axelrad et al., 2016).

1.2.1. Нарушение эпителиального барьера в кишечнике при ВЗК

Нарушение эпителиального барьера в кишечнике является отличительной особенностью ВЗК, дефекты этого барьера могут проявляться на разных уровнях. К таким дефектам относят нарушение мукусного барьера (истончение мукуса, нарушение гликозилирования муцина²), нарушение адгезивных и плотных клеточных контактов, приводящее к увеличению проницаемости эпителия для бактерий и их метаболитов (Antoni et al., 2014).

Было показано, что у пациентов с язвенным колитом слой мукуса истончен (Pullan et al., 1994; Strugala et al., 2008; Swidsinski et al., 2007). Согласно различным исследованиям, такие изменения мукусного барьера могут быть следствием нарушения дифференцировки бокаловидных клеток и продукции мукуса (Alipour et al., 2016; Dorofeyev et al., 2013; Gersemann et al., 2009; Sheng et al., 2012; Tytgat et al., 1996). Было показано, что в толстой кишке пациентов с язвенным колитом снижено количество бокаловидных клеток, а также снижен уровень экспрессии муцинов в этих клетках и уровень гликозилирования муцинов (Dorofeyev et al., 2013). Помимо этого, снижение защитных свойств мукусного барьера может происходить из-за нарушения гликозилирования и сульфатирования муцина (Fu et al., 2011; Hanski et al., 1999; Larsson et al., 2011; Shirazi et al., 2000). Стоит отметить противоречивость данных, полученных в исследованиях с участием пациентов с ВЗК. Некоторые результаты указывают на снижение продукции муцина, в то время как в других исследованиях количество мукуса не отличается, или даже увеличивается, но сопровождается нарушением посттрансляционных модификаций муцина. Таким образом, нарушение мукусного барьера при ВЗК, вероятно, имеет сложную этиологию с вовлечением различных молекулярных механизмов.

Такие нарушения барьерной функции в кишечнике могут происходить как из-за наличия генетических факторов, так и из-за воспаления и дисбиоза. Выявлен ряд генов, вовлеченных в продукцию и гликозилирование муцина, формирование плотных и адгезивных контактов, которые ассоциированы с нарушением барьерной функции при ВЗК (McCole, 2014; McGovern et al., 2010; Moehle et al., 2006), что подтверждает вовлеченность генетических факторов в развитие данных заболеваний. Одним из таких генов, ассоциированных с развитием болезни Крона, является ген *FUT2*, который кодирует фермент фукозилтрансфераза 2 (основной фермент, осуществляющий

фукозилирование белков в ЖКТ) (McGovern et al., 2010). Помимо этого, исследования с участием людей, несущих полиморфизм в гене *FUT2*, выявили что наличие полиморфизма ассоциировано с изменением микрофлоры кишечника, что также может вносить вклад в патогенез ВЗК (Rausch et al., 2011; Wacklin et al., 2011). В другом исследовании были выявлены ассоциированные с ВЗК полиморфизмы в генах, кодирующих муцины, а также снижение экспрессии этих генов у пациентов с ВЗК (Moehle et al., 2006). Однако данные некоторых исследований с участием пациентов с ВЗК и их здоровых родственников говорят о том, что само по себе генетически обусловленное нарушение барьерной функции не всегда приводит к патологии, вероятно, заболевание развивается под влиянием внешних факторов (Bodger et al., 2006; Fries et al., 2005; Tysk et al., 1991).

Нарушение кишечного барьера также может быть и следствием развития ВЗК, например, из-за острого воспаления в кишечнике. Многие исследования указывают на то, что изменения мукусного слоя наблюдаются при активном колите и коррелируют с тяжестью заболевания (Dorofeyev et al., 2013; Larsson et al., 2011; Tytgat et al., 1996; Van Klinken et al., 1999). Ослабление мукусного барьера может приводить к проникновению бактерий во внутренний слой мукуса и увеличивать вероятность контакта бактерий с кишечным эпителием и мукозальной иммунной системой. Подтверждение этому можно найти в работе M.E.V. Johansson с соавторами, в которой показано, что в различных моделях колита на мышах и у некоторых пациентов с язвенным колитом бактерии были обнаружены во внутреннем слое мукуса, в норме свободном от бактерий (Johansson et al., 2014). Такая возможность контакта бактерий с эпителиальными клетками и компонентами мукозального иммунитета кишечника может также быть фактором риска нарушения целостности эпителия и развития сильного воспаления.

Помимо нарушений, связанных с мукусным барьером, риском развития ВЗК является повышенная проницаемость кишечного эпителия. Исследования с участием пациентов с ВЗК выявили, что с данными заболеваниями ассоциированы изменения экспрессии белков плотных контактов (Gassler et al., 2001; Vetrano et al., 2008; Zeissig et al., 2007). Такие нарушения могут быть одной из причин увеличения проницаемости кишечного эпителия у пациентов с ВЗК. Также известно, что некоторые цитокины, например, TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17, могут оказывать влияние на проницаемость эпителия. У пациентов с ВЗК зачастую повышен уровень различных воспалительных

цитокинов, что также может вносить вклад в повышение проницаемости кишечника (Lee, 2015). Есть данные о том, что у пациентов с ВЗК в стадии ремиссии повышенная проницаемость эпителия коррелирует с симптомами раздраженного кишечника и повышенной экспрессией *TNF α* (Vivinus-Nébot et al., 2014). Таким образом, изменение проницаемости кишечника может быть результатом развития заболевания. С другой стороны, исследования с участием пациентов, страдающих от болезни Крона, и их ближайших родственников выявили генетически обусловленную повышенную проницаемость кишечника (Buhner et al., 2006; Fries et al., 2005), что может приводить к развитию воспаления под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды.

Помимо этого, барьерная функция в кишечнике зависит и от микрофлоры, которая влияет на продукцию, расщепление и гликозилирование муцина (Caballero-Franco et al., 2007; Desai et al., 2016; Wrzosek et al., 2013). Исследования с участием пациентов с ВЗК демонстрируют связь между дисбиозом и смещением метаболической активности микрофлоры, способствующей воспалению и нарушению барьера в кишечнике (Duboc et al., 2013; Morgan et al., 2012). Таким образом, нарушения барьерной функции при ВЗК могут быть как причиной, так и следствием заболевания.

1.2.2. Нарушение иммунной функции в кишечнике при ВЗК

ВЗК характеризуются наличием сильных, зачастую трудно контролируемых воспалительных процессов в кишечнике, обуславливающих большинство симптомов и осложнений данных заболеваний. При этом развитие воспаления в кишечнике может происходить как вследствие нарушения защитных барьеров, так и из-за нарушений со стороны иммунной системы и микрофлоры. В воспалительные процессы в кишечнике включаются различные компоненты как приобретенного, так и врожденного мукозального иммунитета (Xavier and Podolsky, 2007).

Есть данные о том, что с развитием ВЗК ассоциированы дефекты в генах рецепторов опознавания паттерна (PRRs), которые участвуют в распознавании бактериальных антигенов. Показано, что мутации в гене *NOD2* ассоциированы с болезнью Крона (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). При этом, у пациентов с болезнью Крона обнаруживается активация Th1 иммунного ответа (Matsuoka et al., 2004; Neurath et al., 2002). В исследовании Т. Watanabe с соавторами было показано, что у мышей при

генетически обусловленном дефиците NOD2 стимуляция бактериальными антигенами приводит к повышенной активации сигнального пути NF-κB через TLR2 и усилению Th1 ответа. Таким образом, генетически обусловленные нарушения рецепции антигенов могут приводить к усиленным иммунным ответам (Watanabe et al., 2004). Также известно, что с ВЗК ассоциированы гены других PRRs, например, *TLR4*, *TLR1*, *TLR2*, *TLR6* (Franchimont et al., 2004; Pierik et al., 2006). Таким образом, одной из причин воспаления при ВЗК может быть нарушение восприятия и проведения сигналов, получаемых от микрофлоры.

В воспалительные процессы при ВЗК вовлечены различные механизмы и клетки иммунной системы. Было показано, что у пациентов с ВЗК в дендритных клетках повышена экспрессия TLR2 и TLR4 по сравнению с клетками здоровых пациентов (Hart et al., 2005). Поскольку дендритные клетки являются важным звеном в поддержании гомеостаза и регуляторной функции мукозального иммунитета, такие изменения могут инициировать развитие сильного воспаления, но неизвестно, были эти изменения первичными, или же возникли в процессе патогенеза заболевания. Другие клетки врожденного иммунитета, которые могут вносить огромный вклад в патогенез ВЗК, это нейтрофилы. Было показано, что у пациентов с ВЗК в крови обнаруживается больше активированных, более реактивных в отношении бактериальных антигенов нейтрофилов по сравнению со здоровыми индивидами (Hanai et al., 2004; McCarthy et al., 1991; Somasundaram et al., 2013). Однако, такие изменения, вероятно, происходят из-за наличия острых воспалительных процессов в организме и не являются первопричиной развития заболевания.

Нарушения иммунной системы, связанные с приобретенным иммунитетом, на сегодняшний день изучены гораздо лучше. Многие исследования демонстрировали, что для болезни Крона характерен профиль цитокинов, ассоциирующийся с Th1 ответом, а для язвенного колита – профиль цитокинов Th2 ответа. Однако сейчас получены данные о том, что при обоих заболеваниях могут проявляться оба типа иммунного ответа, что говорит о более сложных иммунных процессах, вовлеченных в патогенез ВЗК (Zhang and Li, 2014). Также в последнее время большую популярность среди исследований, связанных с ВЗК, приобрело изучение Th17 иммунного ответа, поскольку его маркеры обнаруживаются у пациентов с данными заболеваниями. В ряде исследований было показано, что в ткани кишечника пациентов с ВЗК повышена

экспрессия факторов, вовлеченных в данный тип иммунного ответа (Fujino et al., 2003; Geremia et al., 2011; Kobayashi et al., 2008). Также в литературе часто обсуждается роль IL-23 в запуске Th17 и Th1 ответов в кишечнике при ВЗК. Основанием для этого служат данные о том, что у пациентов с ВЗК обнаружены полиморфизмы в гене рецептора данного цитокина (*IL23R*), что может служить генетическим фактором развития заболевания (Duerr et al., 2006). Было показано, что стимуляция цитокином IL-23 CD4⁺-клеток, выделенных из lamina propria пациентов с язвенным колитом, повышала продукцию клетками IL-17A, а клетки от пациентов с болезнью Крона реагировали на такое воздействие повышением продукции INF- γ (Kobayashi et al., 2008).

Поскольку ВЗК сопровождаются воспалительными процессами в кишечнике, снижение воспаления является одним из способов терапии. Одним из самых известных и широко используемых методов является терапия антителами против TNF- α . Однако, данный способ имеет ряд серьезных побочных эффектов, а также в части случаев оказывается неэффективным (Cohen and Sachar, 2017). Данные о вовлеченности различных цитокинов в кишечное воспаление, полученные при изучении пациентов с ВЗК и экспериментальных моделей на животных, стимулировали разработку терапевтических методов с использованием нейтрализующих антител, специфичных к конкретным цитокинам, например, к INF- γ , IL-17A, IL-13, IL-12, IL-23 и другим факторам. При этом, воздействие на многие из этих мишеней давало противоречивые результаты и оказывалось недостаточно эффективным. Однако методы, направленные на ограничение миграции иммунных клеток в область воспалительного процесса, часто демонстрировали положительные результаты при язвенном колите (Bilsborough et al., 2016).

Развитие неконтролируемого воспаления может быть также следствием нарушения функции регуляторных Т-клеток. Много о роли данных клеток в развитии кишечного воспаления известно из экспериментов на лабораторных животных. Было показано, что перенос наивных Т-клеток CD4⁺CD45RB^{high}, выделенных из селезенки, мышам с генетически обусловленным иммунодефицитом (SCID, *Rag*^{-/-}) приводил к развитию колита (Cahill et al., 1997; Powrie et al., 1993). Дополнительный перенос клеток CD4⁺CD45RB^{low}, а также CD4⁺CD25⁺ клеток предотвращал развитие воспаления (Mottet et al., 2003; Powrie et al., 1993). Роль регуляторных Т-клеток также была продемонстрирована при помощи генетических моделей на животных. Мыши с

мутациями в генах факторов, вовлеченных в функцию регуляторных Т-клеток, например, *IL10*, *IL2*, *IL2ra*, *IL2rb* демонстрируют развитие воспаления в кишечнике (Poussier et al., 2000; Rennick et al., 1997). Однако, исследования с участием пациентов с ВЗК демонстрируют, что функция регуляторных Т-клеток при данных заболеваниях не снижена (Maul et al., 2005). Более того, в некоторых работах было показано, что в слизистой оболочке кишечника в активной фазе заболевания регуляторных Т-клеток даже больше, чем в ткани без воспаления (Lord et al., 2012; Maul et al., 2005; Yu et al., 2007). Однако данные генетических исследований демонстрируют ассоциацию генов *IL10*, *IL2*, *IL21* с ВЗК (Andersen et al., 2010; Festen et al., 2009; Franke et al., 2008).

Итак, патогенез ВЗК характеризуется сильным и трудно контролируемым воспалением, возникновение такого состояния может быть обусловлено как генетическими особенностями, так и нарушением функции иммунной системы в результате заболевания.

1.2.3. Нарушение микрофлоры в кишечнике при ВЗК

Еще одной особенностью ВЗК является нарушение кишечной микрофлоры (Babicova and Gardlik, 2015). Более 90% нормальной микрофлоры кишечника человека представлено четырьмя типами бактерий. Типы *Firmicutes* (49-76%) и *Bacteroidetes* (16-23%) являются доминирующими, и менее представлены типы *Proteobacteria* и *Actinobacteria* (Matsuoka and Kanai, 2015). В исследованиях с участием пациентов с ВЗК были выявлены различные нарушения кишечной микрофлоры и уменьшение ее разнообразия. Так, при исследовании микрофлоры пациентов с ВЗК наблюдались изменения в составе бактерий типа *Firmicutes*: было выявлено сокращение бактерий *Lachnospiraceae* (Frank et al., 2007), *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacteria* (Sokol et al., 2009), а также различные изменения разнообразия бактерий типа *Bacteroidetes* (Frank et al., 2007). При этом остается непонятным, являются ли изменения в микрофлоре причиной ВЗК или возникают в результате воспаления. При сравнении пациентов с ВЗК с их ближайшими здоровыми родственниками были получены различные результаты. Например, в исследованиях пациентов с язвенным колитом и их здоровых близнецов было обнаружено, что микрофлора близнецов без колита была ближе к микрофлоре здоровых людей, нежели к микрофлоре их близнецов с колитом. При этом у пациентов с колитом было много бактерий из родов *Rhodococcus*,

Shigella/Escherichia и *Stenotrophomonas*, как правило, проявляющих патогенные свойства. По мнению авторов, такие изменения в микрофлоре могут быть связаны с нарушением барьерной функции кишечника. Однако у здоровых близнецов было обнаружено большее количество бутират-продуцирующих бактерий, причем таких бактерий было больше как по сравнению с близнецами с колитом, так и со здоровыми индивидами. Авторы работы высказывают предположение о том, что возможно, эти бактерии защищают здоровых близнецов от воспаления благодаря противовоспалительным свойствам бутирата (Lepage et al., 2011). Однако в другой работе снижение количества бутират-продуцирующей бактерии *Faecalibacterium prausnitzii* наблюдалось и у пациентов с язвенным колитом и у их здоровых родственников (Varela et al., 2013). По результатам еще одного исследования у здоровых родственников пациентов с болезнью Крона также были обнаружены изменения микрофлоры по сравнению со здоровыми людьми, не имеющими родственников с ВЗК. Эти изменения тоже отличались от дисбиоза, выявленного у их родственников, страдающих от болезни Крона (Joossens et al., 2011). Таким образом, нарушения микрофлоры при ВЗК могут быть вызваны генетическими и средовыми факторами. Помимо этого, острый воспалительный ответ на кишечную микрофлору также может приводить к дисбиозу (Zeng et al., 2017).

В свою очередь, изменение состава микрофлоры при дисбиозе может вносить вклад в патогенез ВЗК. Симбиотические бактерии в здоровом состоянии обуславливают устойчивость к колонизации патогенов, так как занимают экологические ниши в кишечнике и не дают патогенным бактериям разрастаться. Нарушение микрофлоры может дать возможность патогенным бактериям разрастаться в кишечнике и вызывать воспаление (Buffie and Pamer, 2013). И действительно, исследования с участием пациентов с ВЗК демонстрируют, что заболевания сопровождаются различными инфекциями (Antonelli et al., 2012; Barber et al., 2018). Помимо этого, симбиотические бактерии оказывают влияние на эпителиальные клетки кишечника и иммунную систему хозяина. Такое воздействие осуществляется, например, в результате расщепления пищевых волокон и образовании бутирата. В экспериментах на мышах было показано, что бутират запускает дифференцировку регуляторных Т-клеток (Furusawa et al., 2013), а также известно, что бутират является важным источником энергии для эпителиальных клеток кишечника, стимулирует выработку муцина и

антимикробных пептидов, влияет на проницаемость кишечника (Hamer et al., 2007). При этом в нескольких исследованиях было показано, что количество бутират-продуцирующей бактерии *F. Prausnitzii* (Sokol et al., 2009; Varela et al., 2013) и других бутират-продуцирующих бактерий (Takahashi et al., 2016) у пациентов с ВЗК меньше, чем у здоровых людей. Также у пациентов с язвенным колитом обнаружено увеличение расщепляющих мукус бактерий *Ruminococcus gnavus* и *Ruminococcus torques* (Png et al., 2010). Таким образом, нарушение состава кишечной микрофлоры может влиять на барьерную и иммунную функции кишечника, а также повышать чувствительность к инфекциям, что может осложнить протекание заболеваний. В связи с этим одним из аспектов терапии ВЗК является регуляция состава кишечной микрофлоры.

В рамках терапии ВЗК используются несколько подходов, направленных на модуляцию микрофлоры: применение пребиотиков и пробиотиков, трансплантация фекальной микробиоты, а также антибиотики. Согласно некоторым клиническим исследованиям, использование пребиотиков не приносило терапевтической пользы пациентам с болезнью Крона (Benjamin et al., 2011; Hafer et al., 2007). Однако есть исследования, в которых использование пребиотиков для лечения пациентов с язвенным колитом демонстрировало положительный терапевтический эффект (Casellas et al., 2007; Kanauchi et al., 2002). Также есть данные о положительных эффектах использования пробиотиков при терапии язвенного колита (Kato et al., 2004; Sood et al., 2009; Tursi et al., 2010). Данные об использовании трансплантации фекальной микробиоты при терапии ВЗК весьма противоречивы: есть сообщения об успешном использовании данного подхода, однако, были отмечены случаи неэффективного использования, а также осложнений в виде бактериемии (Qiao et al., 2016). Основным способом модуляции микрофлоры при ВЗК, как правило при наличии сопутствующих инфекций, является антибактериальная терапия. При этом, рекомендуется использовать антибиотики при инфекции, сепсисе и избыточной бактериальной нагрузке (Gomollón et al., 2017). Несмотря на то, что эффективность антибактериальной терапии была показана в ряде исследований, имеют место и противоречивые результаты об эффективности данного подхода (Qiao et al., 2016). Кроме того, применение антибиотиков приводит к сильному снижению бактериального разнообразия, а также опасно из-за вероятности приобретения бактериями устойчивости к антибиотикам. К сожалению, достаточно эффективных

терапевтических подходов для лечения ВЗК до сих пор нет. Из-за вовлеченности многих факторов в патогенез данных заболеваний, а также из-за тесных взаимосвязей между функцией иммунной системы и микрофлорой, необходимо изучать механизмы обеспечения гомеостаза в кишечнике и разрабатывать новые способы его восстановления и поддержания.

1.2.4. Экспериментальные модели ВЗК на лабораторных животных

Процессы, сопровождающие ВЗК, изучаются уже более 20 лет, однако, из-за вклада множества факторов и вовлеченности огромного количества молекулярных механизмов, этиология и патогенез данных заболеваний изучены еще не до конца. Для того чтобы исследовать отдельные механизмы, которые могут иметь место при данных заболеваниях, разработано большое количество экспериментальных моделей на лабораторных животных. Одними из широко используемых моделей являются химически-индуцированные колиты, при которых острое или хроническое воспаление развивается в результате воздействия агрессивных химических веществ (таких, как декстран сульфат натрия, 2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота, оксазолон и др.), повреждающих мукозальный барьер (Randhawa et al., 2014). Другой тип моделей ВЗК – генетические модели, в которых при помощи методов геной инженерии модифицируют работу различных генов, что приводит к частичной или полной утрате функции, или же, наоборот, к гиперфункции целевого гена (Mizoguchi et al., 2016).

Одной из генетических моделей для изучения воспаления в кишечнике являются мыши с нокаутом гена *Muc2*. У *Muc2*^{-/-} мышей не нарабатывается муцин2 (Velcich et al., 2002). Вследствие отсутствия муцина2 эпителиальные клетки кишечника *Muc2*^{-/-} мышей находятся в прямом контакте с бактериями (Johansson et al., 2008). Исследования с использованием данной модели демонстрируют, что при отсутствии муцина2 в кишечнике у мышей спонтанно развивается колит. При этом динамика развития и протекания колита зависит от генетического фона линии мышей. В исследовании *Muc2*^{-/-} мышей на фоне 129SV признаки обострения воспаления обнаруживаются в уже возрасте 4-5 недель (Burger-van Paassen et al., 2011; Van der Sluis et al., 2006). Однако в другом исследовании было показано, что у *Muc2*^{-/-} мышей на генетическом фоне C57BL/6 обострение воспаления наблюдается позже, в возрасте 8-20 недель (Wenzel et al., 2014). При этом колит у *Muc2*^{-/-} мышей имеет сходные признаки

с язвенным колитом у людей (Wenzel et al., 2014). Также показано, что вследствие нарушения наработки муцина2 мыши *Muc2^{-/-}* более чувствительны к различным патогенам, и в присутствии микроорганизмов с патогенными свойствами демонстрируют острое воспаление в кишечнике (Bergstrom et al., 2010; Zarepour et al., 2013). Таким образом, мыши *Muc2^{-/-}* являются моделью ВЗК, которую можно использовать для исследования взаимосвязи изменения кишечной микрофлоры и воспаления в кишечнике. При этом, мыши с данной мутацией на генетическом фоне C57BL/6 в возрасте 8-12 недель не демонстрируют обострения воспаления и могут быть использованы в исследованиях состояний, связанных с ремиссией колита.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что мыши с нарушенной барьерной функцией, с мутацией в гене *Muc2* (*Muc2^{-/-}Kaiso^{-/-}*), более чувствительны к лечению антибиотиками, чем мыши с нормальной барьерной функцией (C57BL/6). Применение смеси антибиотиков широкого спектра действия (кларитромицин, амоксициллин, метронидазол) с целью элиминации инфекции *Helicobacter* spp. вызывало гибель мутантных животных, а также оказывалось неэффективным способом избавления их от инфекции (Литвинова и др., 2015). Поскольку в условиях отсутствия муцина2 эпителиальные и иммунные клетки кишечника находятся в более тесном контакте с микрофлорой, можно предположить, что мыши с мутацией в гене *Muc2* чувствительны к изменению сформировавшейся у них микрофлоры. Помимо этого, такое тесное взаимодействие микрофлоры и иммунной системы может приводить к провоспалительным иммунным реакциям, что в свою очередь, может влиять на микрофлору. При этом отсутствие муцина2, вероятно, приводит к дефициту олигосахаридов, доступных для бактерий в кишечнике, и таким образом, может влиять на состав и функционирование кишечной микрофлоры. Таким образом, при отсутствии муцина2 могут создаваться условия для изменения микрофлоры. И действительно, было показано, что микрофлора *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}* мышей различается (Wu et al., 2018). Таким образом, мыши с нокаутом гена *Muc2* могут выступать в роли чувствительной к изменению микрофлоры модели генетически обусловленного нарушения барьерной функции кишечника. В данной работе исследовались эффекты воздействия на микрофлору *Muc2^{-/-}* мышей антибиотиками и моносахаридом L-фукозой.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Животные и условия содержания

Исследование было выполнено в Центре генетических ресурсов ИЦиГ СО РАН (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015). Все процедуры проводились в соответствии с Европейской директивой 86/609/ЕЕС (Council of the European Communities, 1986) 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). В исследовании использовали животных, свободных от специфических патогенов (расширенный список FELASA 2014), а также животных, положительных на инфекцию *Helicobacter* spp. Согласно международным требованиям к содержанию животных SPF-статуса (свободных от специфических патогенов), в Центре генетических ресурсов проводили мониторинг патогенов по списку, рекомендованному FELASA (Federation for Laboratory Animal Science Associations) (Mähler et al., 2014). В процессе исследования у мышей *Muc2*^{-/-} 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 (Mähler et al., 2014).

В экспериментах №1 и №2 использовали самок мышей инбредных линии C57BL/6 и *Muc2*^{-/-}. Мыши C57BL/6 поступили в центр генетических ресурсов ИЦиГ СО РАН из Jackson Laboratory. Мыши *Muc2*^{-/-} поступили в центр генетических ресурсов ИЦиГ СО РАН из ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологий» РАН, г. Москва. Мыши C57BL/6 были свободны от специфических патогенов, а у мышей *Muc2*^{-/-} детектировалась инфекция *Helicobacter* spp., а также был обнаружен микроорганизм *Tritrichomonas* sp. В остальных экспериментах использовали самок мышей *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{+/+}, полученных в результате скрещивания *Muc2*^{+/-} мышей, свободных от специфических патогенов, а также с инфекциями *Helicobacter* spp. и *Tritrichomonas* sp. Мыши, свободные от инфекции, были получены в Центре генетических ресурсов ИЦиГ СО РАН путем *in vitro* фертилизации с последующей пересадкой эмбрионов (Litvinova et al., 2017).

Мышей содержали 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 К⁺, Mg²⁺ («Северянка», Россия) *ad libitum*.

2.2. Получение мышей *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{+/+}, рожденных с инфекциями *Helicobacter* spp. и *Tritrichomonas* sp.

Мышей *Muc2*^{+/-}, свободных от инфекции, в возрасте 7 недель заразили инфекциями *Helicobacter* spp. и *Tritrichomonas* sp. Заражение осуществляли путем трехкратного внутрижелудочного введения суспензии фекалий, полученных от положительных на данные инфекции мышей. Суспензию готовили следующим образом: три фекалии гомогенизировали в 1 мл питьевой воды, пропускали через клеточный фильтр с диаметром пор 70 мкм и доводили суспензию до объема 1,5 мл. Для внутрижелудочного введения использовали специальные металлические зонды, мышам вводили по 100 мкл суспензии. Через 14 дней после заражения у всех животных в фекалиях детектировались инфекции.

Мышей *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{+/+}, рожденных с инфекцией, получали в результате скрещивания зараженных *Muc2*^{+/-} мышей. Мышей *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{+/+}, свободных от инфекции, получали аналогичным образом, от скрещивания гетерозиготных мышей без инфекции. Схемы заражения и получения мышей представлены на Рисунке 2.1.

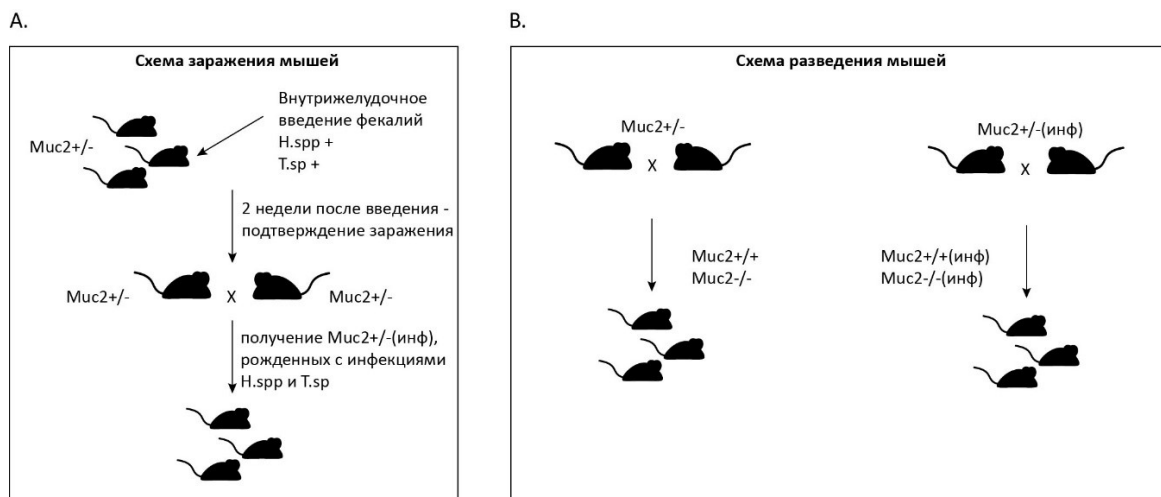


Рисунок 2.1. – Схемы заражения и разведения мышей.

H.spp – *Helicobacter* spp., T.sp – *Tritrichomonas* sp.

2.3. Эксперимент №1. Исследование влияния дефицита муцина2 на иммунный статус мышей

В эксперименте были использованы мыши инбредных линий *Muc2^{-/-}* и C57BL/6. В возрасте 10-12 недель у животных брали кровь из ретроорбитального синуса для анализа иммуноглобулинов, а затем умерщвляли путем краниоцервикальной дислокации. Извлекали толстую кишку и собирали образцы для гистологического анализа, определения количества фукозы и анализа экспрессии генов. Затем толстую кишку разрезали вдоль и делали смыв содержимого фосфатно-солевым буфером, замораживали образец содержимого толстой кишки в жидком азоте для проведения анализа иммуноглобулинов против собственной микрофлоры. Затем кишку разрезали на кусочки и собирали образцы для определения количества иммуноглобулинов.

2.4. Эксперимент №2. Воздействие на микрофлору *Muc2^{-/-}* и C57BL/6 мышей антибиотиками и L-фукозой

Эксперимент проводили на самках мышей инбредных линии *Muc2^{-/-}* и C57BL/6 в возрасте 8-10 недель. Животных в течение двух недель поили антибиотиками широкого спектра действия – кларитромицин (0,1875 мг/мл), метронидазол (0,1875 мг/мл) и амоксициллин (0,5625 мг/мл), которые добавляли в питьевую воду. Также мыши получали антибиотики в сочетании с L-фукозой (в концентрации 0,1%) (экспериментальные группы перечислены в Таблице 1). Животные из контрольной группы употребляли питьевую воду. Питье животные получали *ad libitum* в течение 14 дней. В течение эксперимента животных взвешивали. Часть мутантных мышей, получавших антибиотики, погибали на 13й и 14й дни эксперимента. На 15й день эксперимента у выживших животных собирали фекалии, а затем умерщвляли путем краниоцервикальной дислокации.

Таблица 2.1. – Экспериментальные группы (эксперимент №2)

Название экспериментальной группы	Воздействие
C57BL/6	Контроль, питьевая вода
Muc2 ^{-/-}	
C57BL/6+АБ	Добавление антибиотиков в питьевую воду
Muc2 ^{-/-} +АБ	
C57BL/6+АБ/Ф	Добавление антибиотиков и L-фукозы в питьевую воду
Muc2 ^{-/-} +АБ/Ф	

2.5. Эксперимент №3. Воздействие антибиотиками на микрофлору свободных от инфекций мышей

Данный и последующие эксперименты проводили на мышах, полученных путем скрещивания *Muc2^{+/-}* мышей. Полученное потомство отсаживали от родителей в возрасте 3,5 недель, генотип животных определяли методом ПЦР в реальном времени (см. п.п. 2.18). Эксперимент проводили на мышах *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}*, в возрасте 8 недель животные получали антибиотики с питьевой водой аналогично эксперименту №2 *ad libitum* в течение 14 дней. Перед эвтаназией у животных собирали фекалии для анализа микрофлоры, а затем умерщвляли путем краниоцервикальной дислокации.

2.6. Эксперимент №4. Исследование микрофлоры и иммунного статуса *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}* мышей, рожденных с инфекциями и без

Эксперимент проводили на самках мышей *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}*, полученных путем скрещивания *Muc2^{+/-}* мышей с инфекциями и свободных от инфекций. В возрасте 8-10 недель у мышей брали фекалии для анализа микрофлоры, кровь из ретроорбитального синуса для анализа иммуноглобулинов и лейкоцитов крови, а затем умерщвляли методом краниоцервикальной дислокации. Затем у животных вырезали мезентериальные лимфатические узлы для анализа иммунных клеток. Толстую кишку извлекали, разрезали на кусочки и собирали образцы для определения количества фукозы.

2.7. Эксперимент №5. Воздействие высокой дозой антибиотиков на микрофлору *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями

Эксперимент проводили на самках мышей *Muc2^{-/-}*, рожденных с инфекциями. В возрасте 7-8 недель животным в течение 14 дней предоставляли смесь антибиотиков путем внутрижелудочного введения 200 мкл суспензии (суточная доза составляла 25 мг/кг для кларитромицина и метронидазола, 75 мг/кг для амоксициллина). Доза метронидазола соответствовала дозе, используемой для эффективного избавления от *Trichomonas spp.* у мышей (Cobo et al., 2011). Мышей ежедневно взвешивали. На 8й и 15й дни эксперимента у мышей собирали фекалии для анализа микрофлоры. Животным контрольной группы делали введение питьевой воды, чтобы проверить эффект экспериментальной процедуры на изменение массы тела. В конце эксперимента, на 15й день, мышей умерщвляли путем краниоцервикальной дислокации.

2.8. Эксперимент №6. Воздействие антибиотиками и L-фукозой на микрофлору мышей с инфекциями и без

В эксперименте использовали мышей *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}*, рожденных с инфекциями и без, в возрасте 7-8 недель. Животным в течение 7 дней предоставляли смесь антибиотиков путем внутрижелудочного введения 200 мкл суспензии, доза антибиотиков была аналогична эксперименту №5. Животным из контрольных групп вводили 200 мкл питьевой воды. В течение 7 дней внутрижелудочного введения мыши получали питьевую воду (группы с антибиотиками и контрольные) и питьевую воду с добавлением L-фукозы (0,1%) (группы с антибиотиками и L-фукозой). На 8й день эксперимента способ предоставления антибиотиков сменили, следующие 7 дней мыши получали антибиотики и антибиотики с L-фукозой с питьевой водой аналогично предыдущим экспериментам. В течение всего эксперимента животных ежедневно взвешивали. Схема эксперимента представлена на Рисунке 2.2.

Через 14 дней у животных собирали фекалии для анализа кишечной микрофлоры, брали кровь из ретроорбитального синуса для получения плазмы, а затем умерщвляли методом краниоцервикальной дислокации. У мышей вырезали мезентериальные лимфатические узлы для анализа иммунных клеток. Также извлекали толстую кишку, разрезали на кусочки и собирали образцы для анализа цитокинов. Часть мутантных

мышей с инфекцией, получавших антибиотики, выводили из эксперимента через 13 дней в связи с сильным истощением.

Таблица 2 – Экспериментальные группы (эксперимент №6)

Название группы	Генотип	H.spp и T.sp	Воздействие
Muc2 ^{-/-}	мутантный	нет	Питьевая вода (контроль)
Muc2 ^{+/+}	дикий тип	нет	
Muc2 ^{-/-} -инф	мутантный	есть	
Muc2 ^{+/+} инф	дикий тип	есть	
Muc2 ^{-/-} -АБ	мутантный	нет	Антибиотики
Muc2 ^{+/+} АБ	дикий тип	нет	
Muc2 ^{-/-} -инф./АБ	мутантный	есть	
Muc2 ^{+/+} инф./АБ	дикий тип	есть	
Muc2 ^{-/-} -АБ/Ф	мутантный	нет	Антибиотики и L-фукоза
Muc2 ^{+/+} АБ/Ф	дикий тип	нет	
Muc2 ^{-/-} -инф./АБ/Ф	мутантный	есть	
Muc2 ^{+/+} инф./АБ/Ф	дикий тип	есть	

Схема эксперимента №6



Рисунок 2.2. – Схема эксперимента №6. АБ-антибиотики

2.9. Эксперимент №7. Исследование влияния обеднения микрофлоры на иммунный статус мышей с инфекциями и без

В эксперименте использовали мышей *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}*, рожденных и инфекциями и без, возрасте 7-8 недель. Животным в течение 14 дней предоставляли антибиотики с питьевой водой, аналогично предыдущим экспериментам. На 15й день у мышей брали кровь из ретроорбитального синуса для анализа лейкоцитов, затем умерщвляли методом краниоцервикальной дислокации и брали тимус и селезенку для анализа иммунных клеток.

2.10. Гистологический анализ срезов толстой кишки

Для гистологического анализа образцы толстой кишки длиной примерно 5 мм фиксировали в 10% формалине, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, последовательно проводили через бутанол и ксилол, а затем заключали в парафин. Для анализа готовили срезы толщиной 3 мкм, 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 воспаления, а также общую морфологию ткани. Количество иммунных клеток считали в 15 полях зрения и выражали как количество (N) клеток на 15 полей зрения.

2.11. Анализ экспрессии генов в ткани толстой кишки

Экспрессию генов в ткани толстой кишки оценивали по уровню мРНК соответствующего гена при помощи метода ПЦР в реальном времени.

2.11.1. Выделение РНК из ткани толстой кишки, подготовка образцов РНК

Образец ткани толстой кишки гомогенизировали в 500 мкл TRIzol reagent (Invitrogen, США), затем добавляли 100 мкл хлороформа и центрифугировали 10 минут при 12000 g, +4°C. Водную фазу, содержащую РНК, отбирали в чистую пробирку и обрабатывали 10 е.а. ДНКазы I (Roche, Германия) в течение 30 минут при 25°C, а затем осаждали изопропанолом (на льду в течение 10 минут) и центрифугировали 15 минут при 12000 g, +4°C. Осадки РНК промывали 75% этанолом (+4°C). Образец высушивали и растворяли РНК в ультрачистой воде Milli-Q. Концентрацию РНК в образцах определяли при помощи УФ-видимого спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США).

2.11.2. Реакция обратной транскрипции и количественная ПЦР в реальном времени

кДНК получали путем проведения реакции обратной транскрипции с матрицы РНК, реакцию проводили с обратной транскриптазой M-MuLV (СибЭнзим, Россия) согласно рекомендациям производителя. Смесь, содержащую 5-10 мкг РНК, по 600 нг праймерных олигонуклеотидов Oligo dT и Random hexamer и дезоксинуклеотидтрифосфаты (в концентрации 1 мМ для каждого), нагревали до 65°C в течение 5 минут и денатурировали в течение 5 минут на льду. Затем в реакционную

смесь добавляли обратную транскриптазу (100 е.а.) и реакционный буфер. Реакцию проводили при 37°C в течение часа, а затем инактивировали фермент нагреванием до 70°C в течение 5 минут. Полученные образцы кДНК разводили в 5 раз ультрачистой водой Milli-Q и хранили при -20°C.

Уровень мРНК целевых генов оценивали по относительному количеству кДНК в образце при помощи количественной ПЦР в реальном времени. Последовательности праймерных олигонуклеотидов представлены в Приложении №1. Все праймерные последовательности подбирали при помощи программ Primer-BLAST (Ye et al., 2012) и Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Реакционная смесь содержала БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue 1x (БиоЛабМикс, Россия), соответствующие праймеры (300 нМ каждого) и кДНК. ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США). ДНК денатурировали 5 минут при 95°C, затем проводили 40 циклов: 95°C 15 секунд; 62°C 25 секунд; 72°C 25 секунд.

Экспрессию генов определяли по уровню мРНК целевого гена, нормированному на мРНК гена бета-тубулина (*Tubb5*) по формуле $2^{-(Ct_{Tubb5} - Ct_{\text{целевого гена}})}$, где Ct – цикл, соответствующий пороговому уровню светимости продукта ПЦР.

2.12. Выделение ДНК из фекалий и содержимого кишечника

Фекалию (100-200 мкг) или образец содержимого кишечника лизировали в Inhibitex Buffer (Qiagen, Германия) 30 минут при 70°C, гомогенизировали и центрифугировали при 10000 об/мин 5 минут. В чистую пробирку переносили 100 мкл супернатанта и добавляли 1 мкл протеиназы К (Thermo Scientific, США), 100 мкл AL Buffer (Qiagen, Германия), перемешивали и инкубировали 10 минут при 70°C. Затем добавляли 100 мкл 96% этилового спирта и 10 мкл суспензии SiO₂ (100мкг/мкл), перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 минут. Затем образцы центрифугировали при 4000 об/мин 5 минут и удаляли супернатант. Осадок промывали последовательно AW1 Buffer (Qiagen, Германия), AW2 Buffer (Qiagen, Германия) и 70% этиловым спиртом. После последней промывки осадок высушивали и растворяли ДНК в 100 мкл ультрачистой воды Milli-Q и центрифугировали образец при 10000 об/мин 10 минут. Супернатант, содержащий ДНК переносили в чистую пробирку и определяли концентрацию ДНК в образце и отсутствие примесей при помощи УФ-видимого

спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Образцы ДНК хранили при -20°C до ПЦР анализа.

2.13. Определение бактериальной ДНК в фекалиях методом количественной ПЦР в реальном времени

Количество бактерий в кишечнике оценивали по количеству бактериальной ДНК, нормированному на ДНК *Mus musculus* в фекалиях при помощи метода количественной ПЦР в реальном времени. ДНК *Helicobacter*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* spp. определяли при помощи праймеров к участку гена *16S rRNA* соответствующей группы бактерий. Для определения общего количества бактерий использовали праймеры к консервативному участку бактериального гена *16S rRNA*. Количество ДНК *Mus musculus* определяли при помощи праймеров к участку гена *28S rRNA* мыши. Все последовательности олигонуклеотидов представлены в Приложении №1. Все праймерные последовательности подбирали при помощи программ Primer-BLAST (Ye et al., 2012) и Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Реакционная смесь содержала БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue 1x (БиоЛабМикс, Россия), соответствующие праймеры (300 нМ каждого) и ДНК, выделенной из фекалий. ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США). ДНК денатурировали 5 минут при 95°C, затем проводили 40 циклов: денатурация – 95°C 15 секунд, отжиг праймеров – 62°C 25 секунд, синтез – 72°C 25 секунд.

Нормирование бактериальной ДНК на ДНК мыши (*M. musculus*) выполняли по формуле: $2^{(Ct_{M.musculus} - Ct_{целевой\ бактерии})}$, где Ct – цикл, соответствующий пороговому уровню светимости продукта ПЦР.

2.14. Оценка разнообразия бактериальной микрофлоры методом одноцепочечного конформационного полиморфизма (Single-strand conformation polymorphism – SSCP) гена *16S rRNA*

За основу метода брали методику, предложенную F. Schwieger и C.C. Tebbe в 1998 году (Schwieger and Tebbe, 1998). С матрицы ДНК, выделенной из фекалий, проводили амплификацию ДНК переменного участка V4 гена *16S rRNA*. Для проведения ПЦР использовали рекомбинантную ДНК полимеразу Phusion High-Fidelity DNA Polymerase и GC-Buffer для полимеразы (Thermo Scientific, США). Концентрация праймеров была

500 нМ каждого, обратный праймер был фосфорилирован на 5'-конце (последовательности праймеров представлены в Приложении №1). Реакцию проводили в амплификаторе T100TM Thermal Cycler (BioRad Laboratories, США). ДНК денатурировали при 98°C 3 минуты, а затем проводили 35 циклов: 98°C 15 секунд, 50°C 20 секунд, 72°C 20 секунд. Наличие продукта ПЦР проверяли при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Продукты ПЦР вычищали из реакционной смеси с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. С очищенными образцами ставили реакцию с экзонуклеазой фага лямбда (Lambda Exonuclease, Thermo Scientific, США) согласно рекомендациям производителя. Данный фермент обладает активностью по отношению к двуцепочечным ДНК при наличии в них фосфатных групп на 5'-конце, с его помощью получали одноцепочечные ДНК. Полученные одноцепочечные ДНК упаривали до объема 10 мкл и денатурировали 5 минут при температуре 95°C в 15 мкл денатурирующего буфера (95% формамид; 10мМ КОН), затем охлаждали реакционную смесь на льду. К полученным образцам добавляли краску (0,1% бромфеноловый синий; 0,1% ксиленцианол) в соотношении 1:100, наносили ДНК на 15% полиакриламидный гель и проводили электрофорез в 1х трис-боратном буфере (89 мМ Трис; 89 мМ борная кислота; 2мМ ЭДТА) при напряжении 220В 20 часов.

После электрофореза гель красили серебром, за основу метода использовали опубликованную методику (Bassam and Gresshoff, 2007). Гель промывали ультрачистой деионизированной водой Milli-Q и фиксировали 30 минут в 7% водном растворе ледяной уксусной кислоты. Затем отмывали гель от кислоты водой Milli-Q 3 раза по 2 минуты и оставляли в растворе серебра (0,1% AgNO₃, 0,15% параформальдегид) на 40 минут. Раствор серебра удаляли и промывали гель водой Milli-Q 20 секунд, а затем споласкивали 30 секунд холодным (+4°C) буфером для проявки (3% Na₂CO₃; 0,3% параформальдегид; 0,0002% Na₂S₂O₃). Затем удаляли буфер и проявляли гель холодным буфером для проявки примерно 15 минут. Гель фотографировали при помощи геля документирующей системы Gel DocTM XR+ System (BioRad Laboratories, США).

2.15. Метагеномный анализ бактериальной микрофлоры кишечника мышей

Метагеномный анализ кишечной микрофлоры проводили путем секвенирования ампликонов гена 16S rRNA (регионы V4, V3-V4, V4-V5) в образцах ДНК, выделенных из фекалий. ДНК для метагеномного анализа выделяли при помощи набора QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно рекомендациям производителя. Дальнейшая подготовка образцов (синтез ампликонов и создание библиотек), секвенирование парных прочтений на платформе Illumina (длина прочтения 250 п.н.) и обработка данных осуществлялись компанией Novogene (Китай). Альфа-разнообразие оценивалось по индексам Шеннона и Симпсона, бета-разнообразие по анализу weighted и unweighted Unifrac.

2.16. Секвенирование и филогенетический анализ ДНК 18S rRNA

Tritrichomonas spp.

Для проведения филогенетического анализа проводили секвенирование ДНК гена 18S rRNA микроорганизма *Tritrichomonas* spp., обнаруженного у мышей с инфекцией. С образцами ДНК, выделенными из содержимого кишечника мышей, поставили две ПЦР, используя рекомбинантную ДНК полимеразу Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, GC-Buffer для полимеразы (Thermo Scientific, США) и специфичные к ДНК гена 18S rRNA *Tritrichomonas* spp. праймеры (Dimasua and Rivera, 2013) (см. Приложение №1; соответствие пар праймеров: реакция1 – T18S-F+T18S-Ri, реакция2 – T18S-Fi+T18S-R). Условия реакции: 95°C 5 минут, а затем 30 циклов: 95°C 60 секунд, 56°C 60 секунд, 72°C 120 секунд. Продукт ПЦР вычищали из реакционной смеси при помощи набора ALMA-CleanUp (Альмабион, Россия).

С очищенными продуктами ПЦР ставили реакцию синтеза для секвенирования. Для образца ставили 4 реакции (с каждым из четырех праймеров). Реакции синтеза проводили с использованием BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), матрицу ДНК брали в реакцию из расчета 25 нг/1000 а.о., концентрация праймера была 1 мкМ. Условия реакции: 96°C 60 секунд, а затем 35 циклов: 96°C 30 секунд, 56°C 15 секунд, 60°C 4 минуты.

После проведения реакции образцы вычищали из реакционной смеси (объемом 10 мкл), для этого добавляли 50 мкл воды Milli-Q и 90 мкл изопропанола (+4°C), перемешивали и инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре. Затем осаждали образцы центрифугированием в течение 20 минут при 14000 об/мин, 20°C,

удаляли супернатант. Осадки два раза промывали 70% этанолом (+4°C), центрифугировали 10 минут при 14000 об/мин, +4°C, удаляли супернатант. После промывки осадки высушивали при помощи вакуумного концентратора CentriVar Solvent package (Labconco, США) и отдавали для секвенирования в ЦКП «Молекулярная и клеточная биология» ИМКБ СО РАН. Полученные последовательности анализировали при помощи программ Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012) и BLASTN (Zhang et al., 2000).

Из полученных последовательностей собрали последовательность ДНК гена 18S rRNA микроорганизма *Tritrichomonas* sp. длиной 1355 а.о. Полученную последовательность исследовали при помощи программы BLASTN. Для филогенетического анализа отобрали 11 последовательностей (список последовательностей представлен в Приложении №2), которые выровняли при помощи алгоритма MUSCLE и на основе выравнивания построили филогенетическое дерево методом максимального правдоподобия при помощи онлайн-сервиса IQ-tree (Trifinopoulos et al., 2016), а затем дерево визуализировали при помощи программы FigTree.

2.17. Определение ДНК обнаруженного *Tritrichomonas* sp. в фекалиях методом количественной ПЦР в реальном времени

Количество обнаруженного микроорганизма в кишечнике оценивали по количеству его 18S rRNA ДНК нормированному на ДНК *Mus musculus* в фекалиях при помощи метода количественной ПЦР в реальном времени. ДНК *Tritrichomonas* sp. определяли при помощи специфичных к отсеквенированной последовательности праймеров. Количество ДНК *Mus musculus* определяли с помощью праймеров к участку гена 28S rRNA мыши. Все последовательности олигонуклеотидов представлены в Приложении №1. Праймерные последовательности для обнаружения ДНК *Tritrichomonas* sp. подбирали при помощи программы Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012), а затем выравнивали в программе Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Полученные праймеры не отжигались ни на одну последовательность из баз данных, используемых Primer-BLAST, что говорит о специфичности подобранных праймеров только в отношении отсеквенированной последовательности. Реакционная смесь содержала БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue 1x (БиоЛабМикс, Россия), соответствующие

праймеры (300 нМ каждого) и ДНК, выделенную из фекалий. ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США). Условия реакции: 5 минут при 95°C, а затем 37 циклов: 95°C 15 секунд, 58°C 25 секунд, 72°C 25 секунд.

Нормирование ДНК *Tritrichomonas* sp. на ДНК мыши (*M. musculus*) выполняли по формуле: $2^{-(Ct_{M.musculus} - Ct_{Tritrichomonas\ sp.})}$, где Ct – цикл, соответствующий пороговому уровню светимости продукта ПЦР.

2.18. Определение генотипа мышей, полученных от скрещивания *Muc2*^{+/-}

Для определения генотипа полученных мышей, из образцов ткани ушей и хвостов выделяли геномную ДНК. Образец лизировали ночь при 55°C в буфере (0,1М NaCl; 50mM TrisHCl pH=8; 2,5mM EDTA; 0,5% SDS) с добавлением протеиназы К (Thermo Scientific, США) в концентрации 80мкг/мл. Затем образцы гомогенизировали, осаждали белок добавлением ацетата калия (конечная концентрация 1,7М). Затем экстрагировали ДНК хлороформом и центрифугировали (12000 g, 10 минут). Супернатант переносили в чистую пробирку и осаждали ДНК добавлением трех объемов 96% этилового спирта (3 часа при -20°C), затем центрифугировали (12000 об/мин, 15 минут), промывали 70% этиловым спиртом и растворяли ДНК в ультрачистой воде Milli-Q. С выделенной геномной ДНК проводили ПЦР в реальном времени с двумя парами праймеров (последовательности представлены в Приложении №1): 1) к участку гена *Muc2*, отсутствующему в мутантном аллеле – определяет аллель дикого типа); 2) к участку гена устойчивости к неомицину, который присутствует в мутантном аллеле – определяет мутантный аллель. Реакционная смесь содержала БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue 1x (БиоЛабМикс, Россия), соответствующие праймеры (300 нМ каждого) и ДНК. ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США). Условия реакции: 5 минут при 95°C, а затем 35 циклов: 95°C 15 секунд, 60°C 25 секунд, 72°C 25 секунд.

2.19. Определение количества IgA в толстой кишке методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Для определения IgA брали кусочек толстой кишки размером около 5 мм, образец замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C до анализа. Образец гомогенизировали в жидком азоте и разбавляли 200 мкл натрий-фосфатного буфера,

перемешивали и оставляли на льду до осаждения мелких кусочков. Затем образцы разводили в 10 раз натрий-фосфатным буфером. Для определения IgA разведенные образцы (100 мкл) сорбировали на 96-луночный иммунологический планшет и инкубировали 2 часа (37°C, 400 об/мин). Затем планшет промывали 3 раза по 300 мкл буфером для промывки (0,05% Tween-20 в натрий-фосфатном буфере) и блокировали 2% БСА в натрий-фосфатном буфере (150 мкл на лунку) ночь при +4°C. Далее планшет промывали и инкубировали с антителами против IgA мыши, меченными биотином (BD Pharmingen, США) 30 минут (37°C, 400 об/мин). После инкубации планшет промывали и инкубировали со стрептавидин-пероксидазой (BD Pharmingen, США) 30 минут (37°C, 400 об/мин). Далее планшет промывали и инкубировали с субстратом АБТС (2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоукислота)). Для приготовления раствора субстрата 1 таблетку АБТС (Thermo Scientific, США) растворяли в 10 мл фосфатно-цитратного буфера и добавляли перекись водорода до концентрации 0,3%. Через 15 минут реакцию останавливали добавлением 1% SDS. Оптическую плотность определяли на планшетном фотометре при длине волны 405 нм. В качестве стандартов для построения калибровочной кривой использовали очищенный IgA мыши (BD Pharmingen, США) в концентрациях 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625 мкг/мл. Реакции для построения стандартной кривой делали параллельно с образцами аналогичным образом. Количество IgA нормировали на количество общего белка в пробе и выражали в нг/мкг белка. Количество белка определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976).

2.20. Определение количества IgG в крови против собственной микрофлоры и количества IgG в толстой кишке методом ИФА

Для определения IgG против собственной микрофлоры в крови у животных собирали 200 мкл крови из ретроорбитального синуса, центрифугировали 15 минут (3000 об/мин +4°C), собирали сыворотку и хранили на -20°C до анализа. Смывы содержимого кишечника замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C до анализа. В смывах толстой кишки определяли концентрацию белка по методу Брэдфорда (Bradford, 1976). Образцы смывов разбавляли до концентрации белка 100 мкг/мл натрий-фосфатным буфером и сорбировали на 96-луночный иммунологический планшет в дублях (2 часа при 37°C, 400 об/мин), а затем промывали 3 раза по 300 мкл буфером для промывки (0,05% Tween-20 в натрий-фосфатном буфере) и блокировали

2% БСА в натрий-фосфатном буфере ночь при +4°C. Затем планшет промывали и добавляли соответствующую сыворотку, разведенную натрий-фосфатным буфером в один дубликат (для определения IgG против собственной микрофлоры в крови) и 100 мкл натрий-фосфатного буфера во второй дубликат (определение количества IgG в толстой кишке), планшет инкубировали 2 часа (37°C, 400 об/мин), а затем промывали и инкубировали с антителами против IgG мыши, меченными биотином (BD Pharmingen, США) 30 минут (37°C, 400 об/мин). Далее планшет промывали и инкубировали со стрептавидин-пероксидазы (BD Pharmingen, США) 30 минут (37°C, 400 об/мин). Затем промывали планшет и инкубировали с субстратом АБТС, через 15 минут реакцию останавливали добавлением 1% SDS. Оптическую плотность определяли при длине волны 405 нм. В качестве стандартов для построения калибровочной кривой использовали очищенный IgG мыши (BD Pharmingen, США) в концентрациях 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625 мкг/мл. Реакции для построения стандартной кривой делали параллельно с образцами аналогичным образом. Количество IgG в толстой кишке нормировали на количество общего белка в пробе и выражали в нг/мкг белка. Количество белка определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976). Количество IgG против собственной микрофлоры определяли вычитанием оптической плотности в лунках без добавления сыворотки из оптической плотности лунок с добавлением сыворотки, а затем вычисляли концентрацию IgG при помощи калибровочной кривой и выражали в мкг/мл.

2.21. Определение IgG и IgA в крови методом ИФА

Для определения количества IgG и IgA в крови, у животных брали 200 мкл крови из ретро-орбитального синуса, центрифугировали 15 минут (3000 об/мин +4°C), собирали сыворотку и хранили на -20°C до анализа. В анализ брали сыворотку, разведенную 1:200 натрий-фосфатным буфером (для анализа IgG) и 1:100 (для анализа IgA) и сорбировали на 96-луночный иммунологический планшет (2 часа, при комнатной температуре). Затем промывали планшет буфером для промывки (0,05% Tween-20 в натрий-фосфатном буфере) и инкубировали с 2% БСА в натрий-фосфатном буфере ночь. После инкубации промывали планшет и инкубировали с антителами против IgG или IgA мыши, меченными биотином (BD Pharmingen, США) 60 минут (37°C, 400 об/мин). Затем планшет промывали и инкубировали со стрептавидин-

пероксидазы (BD Pharmingen, США) 60 минут (37°C, 400 об/мин). Далее промывали планшет и инкубировали с субстратом АБТС, через 15 минут реакцию останавливали добавлением 1% SDS. Оптическую плотность определяли при длине волны 405 нм. В качестве стандартов для построения калибровочной кривой использовали очищенный IgG мыши (BD Pharmingen, США) в концентрациях 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625 мкг/мл. Реакции для построения стандартной кривой делали параллельно с образцами аналогичным образом. Количество иммуноглобулинов выражали в мкг/мл.

2.22. Анализ лимфоцитов в крови методом проточной цитофлуориметрии

У животных собирали 200 мкл крови с гепарином и помещали в пробирку, содержащую 100 мкл натрий-фосфатного буфера и 5 мкл гепарина. Пробирки с образцами помещали на лед. Эритроциты лизировали при помощи гипотонического буфера (0,15М NH₄Cl; 0,01М NaHCO₃; 0,001М EDTA; +4°C) при комнатной температуре 10 минут, а затем центрифугировали 5 минут (1500 об/мин, +4°C). Убирали супернатант и повторно лизировали оставшиеся эритроциты. Далее клетки промывали 2 раза 2% БСА в натрий-фосфатном буфере и разбавляли буфером для окрашивания (1% БСА, 0,1% азид натрия в натрий-фосфатном буфере) до концентрации 800-1500 клеток/мкл. Клетки инкубировали с антителами PE-anti-CD3ε, FITC-anti-CD4, PE/Cy7-anti-CD8α и PE-anti-CD3ε, FITC-anti-CD19, PE/Cy7-anti-CD45 (BioLegend, США) в темноте при +4°C 120 минут. Анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8HT Flow Cytometer (Merk, Германия), в каждом образце анализировали 25000 лимфоцитов. В популяции лимфоцитов выделяли одиночные клетки (синглеты). Затем процент CD3⁺- и CD19⁺-лимфоцитов определяли среди CD45⁺-лимфоцитов. Процент CD3⁺CD4⁺- и CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов определяли среди CD3⁺-лимфоцитов (Схема гейтирования представлена в Приложении №3). В крови также определяли концентрацию лейкоцитов путем окрашивания клеток реактивом Türk's solution (Merk, Германия) и подсчета в камере Горяева. Используя концентрацию лейкоцитов, а также процентное соотношение популяций лейкоцитов и лимфоцитов (получено при анализе на цитофлуориметре) определяли концентрацию каждой исследуемой субпопуляции и выражали как 10⁶ клеток/мл крови.

2.23. Анализ клеток селезенки методом проточной цитофлуориметрии

2.23.1. Подготовка суспензии спленоцитов.

Селезенку извлекали, взвешивали и помещали в пробирку 1,5 мл, содержащую 400 мкл натрий-фосфатного буфера, пробирку держали на льду. Гомогенизировали селезенку при помощи гомогенизатора, затем фильтровали суспензию через фильтр для клеток с диаметром пор 70 мкл (BD Falcon, США). Для лизирования эритроцитов добавляли гипотонический буфер (0,15M NH₄Cl; 0,01M NaHCO₃; 0,001M EDTA; +4°C) до объема 5 мл, инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Для определения условного количества клеток (УКК) селезенки, из образца отбирали 50 мкл, оставшийся образец центрифугировали 7 минут при 1500 об/мин, +4°C. Затем удаляли супернатант и промывали суспензию 2 раза 5 мл 2% БСА в натрий-фосфатном буфере. Клетки разбавляли буфером для окрашивания (1% БСА, 0,1% азид натрия в натрий-фосфатном буфере).

2.23.2. Анализ спленоцитов по маркерам CD19, CD3, CD4, CD8

Суспензию клеток разбавляли до концентрации 1500-2000 клеток/мкл, 250 мкл суспензии инкубировали с антителами PE-anti-CD3ε, FITC-anti-CD4, PE/Cy7-anti-CD8α и PE-anti-CD3ε, FITC-anti-CD19 и FITC-anti-CD4, PE-anti-CD45RB (BioLegend, США) при +4°C 120 минут в темноте. Анализ клеток при помощи проточного цитофлуориметра Guava easyCyte 8HT Flow Cytometer (Merk, Германия), в каждом образце анализировали 35000 лимфоцитов. В популяции спленоцитов выделяли одиночные клетки (синглеты). Процент CD3⁺-CD19⁺-лимфоцитов определяли среди одиночных спленоцитов. Процент CD3⁺CD4⁺- и CD3⁺CD8⁺-клеток определяли среди CD3⁺-спленоцитов. Схема анализа представлена в приложении №4.

2.23.3. Определение условного количества клеток (УКК) селезенки

Аликвоту клеток в буфере после лизирования эритроцитов разводили при помощи 2% БСА в натрий-фосфатном буфере и анализировали на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8HT Flow Cytometer (Merk, Германия), в каждом образце считали 15000 спленоцитов. УКК определяли исходя из количества проанализированных клеток и объема образца, использованного для анализа (данный параметр можно определить при помощи цитофлуориметра). Полученные данные выражены как УКК на орган. Данный метод был сравнен с методом определения клеточности в камере Горяева. Было выяснено, что полученное в результате используемого метода количество клеток ниже клеточности органа примерно в 2 раза. Однако, используя данный метод можно

корректно определить различия в количестве клеток у животных. Таким образом, представленные данные не совпадают с абсолютными показателями клеточности селезенки у мышей, но демонстрируют изменение этого параметра при воздействии на микрофлору животных.

2.24. Анализ клеток тимуса методом проточной цитофлуориметрии

Тимус извлекали, взвешивали и помещали в пробирку 1,5 мл, содержащую 400 мкл натрий-фосфатного буфера, пробирку держали на льду. Гомогенизировали тимус при помощи гомогенизатора, затем фильтровали суспензию через фильтр для клеток с диаметром пор 70 мкл (BD Falcon, США), доводили суспензию клеток до объема 1 мл натрий-фосфатным буфером, отбирали 50 мкл для определения клеточности. Оставшиеся клетки промывали 2 раза 2% БСА в натрий-фосфатном буфере (центрифугировали при 1500 об/мин, +4°C, 7 минут). Разбавляли тимоциты буфером для окрашивания (1% БСА, 0,1% азид натрия в натрий-фосфатном буфере) до концентрации 2000-3000 клеток/мкл и инкубировали 250 мкл суспензии с антителами PE-anti-CD3ε, FITC-anti-CD4, PE/Cy7-anti-CD8α, APC-anti-CD25, PerCP-anti-CD44 (BioLegend, США) при +4°C 120 минут в темноте. Анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8HT Flow Cytometer (Merk, Германия), в каждом образце анализировали 70000 тимоцитов. В популяции тимоцитов выделяли одиночные клетки (синглеты). Процент CD4⁺CD8⁺-, CD4⁺CD8⁻-, CD4⁻CD8⁺-, CD4⁻CD8⁻-клеток определяли среди тимоцитов. Процент дубль негативных клеток DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺) и DN4 (CD44⁻CD25⁻) определяли среди CD4⁻CD8⁻CD3⁻-клеток. Схема анализа представлена в приложении №5. УКК тимуса определяли на проточном цитофлуориметре, аналогично УКК селезенки (см. п.п. 2.23.4) и выражали как УКК на 10⁶.

2.25. Анализ лимфоцитов в мезентериальных лимфатических узлах методом проточной цитофлуориметрии

2.25.1. Подготовка суспензии лимфоцитов

Мезентериальные лимфатические узлы вырезали из брыжейки и помещали в пробирку 1,5 мл, содержащую 500 мкл натрий-фосфатного буфера, пробирку держали на льду. Гомогенизировали лимфатические узлы при помощи гомогенизатора, затем

фильтровали суспензию через фильтр для клеток с диаметром пор 70 мкл (BD Falcon, США), доводили суспензию клеток до объема 1 мл натрий-фосфатным буфером, отбирали 50 мкл для подсчета количества клеток в камере Горяева. Затем промывали суспензию 2 раза 2% БСА в натрий-фосфатном буфере (центрифугировали при 1500 об/мин, +4°C, 7 минут). Разбавляли лимфоциты буфером для окрашивания (1% БСА, 0,1% азид натрия в натрий-фосфатном буфере).

2.25.2. Анализ лимфоцитов по маркерам CD4, CD25, Foxp3

Полученную суспензию клеток разбавляли до концентрации 3000-5000 клеток/мкл, 250 мкл суспензии инкубировали с антителами PE/Cy7-anti-CD4 и APC-anti-CD25 (BioLegend, США) 60 минут при +4°C. Затем образцы фиксировали при помощи однократного реактива True-Nuclear™ Fix (BioLegend, США) 50 минут в темноте при комнатной температуре. Затем пермобилизировали клеточную мембрану при помощи реактива однократного True-Nuclear™ Perm Buffer (BioLegend, США), центрифугировали 10 минут (2100 об/мин, 20°C). Далее разбавляли клетки 100 мкл буфера для пермобилизации и инкубировали с антителами AlexaFluor488-anti-Foxp3 (BioLegend, США) 90 минут в темноте при комнатной температуре. Затем образцы промывали буфером для пермобилизации, и буфером для окрашивания. После промывки клетки разбавляли буфером для окрашивания до концентрации 1500-3000 клеток/мкл и хранили в темноте при температуре +4°C до анализа (1-2 дня). Анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8HT Flow Cytometer (Merk, Германия), в каждом образце анализировали 50000 лимфоцитов. В популяции лимфоцитов выделяли одиночные клетки (синглеты), затем выделяли одиночные CD4⁺-лимфоциты. Процент CD25⁺Foxp3⁺-клеток определяли среди CD4⁺-лимфоцитов, количество CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-клеток вычисляли из клеточности и выражали как 10⁶ клеток. Процент CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺Foxp3⁺ определяли среди лимфоцитов. Схема анализа представлена в приложении №6.

2.25.3. Анализ лимфоцитов по маркерам CD19, CD3, CD4, CD8

Суспензию клеток разбавляли до концентрации 1500-2000 клеток/мкл, 250 мкл суспензии инкубировали с антителами PE-anti-CD3ε, FITC-anti-CD4, PE/Cy7-anti-CD8α и PE-anti-CD3ε, FITC-anti-CD19 (BioLegend, США) при +4°C 120 минут в темноте. Анализ клеток при помощи проточного цитофлуориметра Guava easyCyte 8HT Flow

Cytometer (Merk, Германия), в каждом образце анализировали 35000 лимфоцитов. В популяции лимфоцитов выделяли одиночные клетки (синглеты). Процент CD3⁺-CD19⁺-лимфоцитов определяли среди одиночных лимфоцитов. Процент CD3⁺CD4⁺- и CD3⁺CD8⁺-клеток определяли среди CD3⁺-лимфоцитов. Количество клеток во всех исследуемых субпопуляциях определяли исходя из количества лимфоцитов в лимфоузлах, подсчитанного в камере Горяева. Схема анализа представлена в приложении №6.

2.26. Анализ количества IL-1 β в ткани толстой кишки методом ИФА

Образец ткани толстой кишки гомогенизировали в жидком азоте, разбавляли 800 мкл натрий-фосфатного буфера, инкубировали 10 минут на льду, а затем центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин, +4°C. Для определения количества каждого цитокина использовали 100 мкл образца. Анализ проводили при помощи коммерческого набора Mouse IL-1 β ELISA MAX Standard Set (BioLegend, США) согласно инструкциям производителя. Количество цитокинов нормировали на количество белка, определенного по методу Брэдфорда (Bradford, 1976) и выражали как пг цитокина на мг белка.

2.27. Определение количества фукозы в толстой кишке

Образец ткани толстой кишки гомогенизировали в жидком азоте, для анализа брали 5 мг образца и добавляли 1 мл 96% этанола, затем перемешивали 5 минут и центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин, +4°C. Далее переносили по 30 мкл супернатанта в две чистые пробирки, и оставляли на льду для определения количества свободной фукозы (в одной пробирке определяли фукозу, а во второй фон образца). К оставшемуся образцу ткани добавляли еще 1 мл и после повторения описанной выше процедуры удаляли супернатант, чтобы избавиться от следовых остатков свободной фукозы. Затем помещали пробирку с тканью на лед и растворяли осадок в 200 мкл 0,1N NaOH, после растворения переносили по 20 мкл образца в две чистые пробирки для определения связанной с белками фукозы (в одной пробирке определяли фукозу, а во второй фон образца). Во все пробирки с образцами добавляли по 150 мкл реактива серной кислоты (H₂SO₄:H₂O=6:1), охлажденного до 0°C. Далее содержимое пробирок перемешивали и инкубировали в термостате при температуре 100°C, а затем охлаждали под проточной водой. Ко всем пробам, кроме тех, в которые служили для определения

фона, добавляли по 10 мкл 3% гидрохлорид L-цистина (CysHCl) и инкубировали 90 минут при комнатной температуре. Далее определяли оптическую плотность на 405/450 нм. Для построения калибровочных кривых использовали растворы L-фукозы, анализ калибровочных образцов проводили параллельно с экспериментальными образцами аналогичным образом (с шага добавления реактива серной кислоты). Количество фукозы в образцах нормировали на количество белка, определенное методом Брэдфорда (Bradford, 1976) и выражали как мкг фукозы на мкг белка.

2.28. Определение проницаемости кишечника

Проницаемость кишечника определяли по концентрации 4kDa FITC-декстрана, детектируемой в крови через 4 часа после внутрижелудочного введения 100 мкл водного раствора FITC-декстрана (концентрация 20мг/мл). Через 4 часа после введения раствора у животных брали кровь из ретроорбитального синуса (с гепарином), 200 мкл крови смешивали с 200 мкл натрий-фосфатного буфера с 5 мкл гепарина, образцы держали на льду. Образцы центрифугировали 15 минут (3000 об/мин, +4°C) и определяли уровень флуоресценции в плазме при помощи флуориметра Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Количество FITC-декстрана в крови выражали как мкг/мл.

2.29. Определение количества лактата, аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в крови.

Анализ количества лактата и внутриклеточных ферментов в крови проводили с использованием коммерческих наборов «Молочная кислота-ОЛЬВЕКС» и «АЛТ-РФ-ОЛЬВЕКС», «АСТ-РФ-ОЛЬВЕКС» (ОЛЬВЕКС Диагностикум, Россия) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию лактата в крови выражали как моль/л. Количество ферментов в крови оценивали по их активности и выражали как моль/ч*л.

2.30. Статистическая обработка результатов

Все данные представлены как среднее±стандартная ошибка среднего, кроме количества ДНК бактерий и простейшего, для них показаны значения для каждого образца. Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи программного обеспечения Statistica 6.0. Динамика изменения массы животных была исследована при помощи анализа ANOVA с повторными измерениями (repeated

measures ANOVA). Для анализа выборок, не описывающихся 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).

Глава 3. Результаты

3.1. Влияние дефицита муцина2 на иммунный статус мышей (Эксперимент №1)

3.1.1. В ткани толстой кишки у мышей *Muc2^{-/-}* выявлены признаки хронического воспаления

Гистологический анализ был проведен на срезах восходящего отдела толстой кишки мышей *Muc2^{-/-}* и C57BL/6. Анализ гистологических срезов не выявил признаков острого воспаления в исследуемом отделе толстой кишки, как у мышей *Muc2^{-/-}* с нарушенной барьерной функцией, так и у мышей контрольной линии C57BL/6. Основная часть содержимого секреторных гранул бокаловидных клеток представлена гликопротеином муцин2 (Kim and Ho, 2010). На препаратах, окрашенных на ШИК-реакцию (данное окрашивание позволяет выявить полисахариды и гликопротеины), видно, что у мутантных мышей действительно практически отсутствует ШИК-позитивный секрет бокаловидных клеток (на Рисунке 3.1А секрет бокаловидных клеток окрашен розовым цветом). Процент таких клеток в крипте мутантных мышей оказался значительно меньше, чем у C57BL/6 (Mann-Whitney U-test $Z=2,16$ $p < 0,05$; Рисунок 3.1В). При этом, такие признаки воспаления, как отек, эрозия эпителия и крупные лейкоцитарные инфильтраты, не были выявлены, однако у мышей *Muc2^{-/-}* была отмечена гиперплазия крипт. Количество ядер в криптах у мутантных мышей было больше, чем у мышей C57BL/6 (Mann-Whitney U-test $Z=2,16$ $p < 0,05$; Рисунок 3.1Б). Помимо этого, на препаратах толстой кишки, окрашенных азур-2-эозином, у мутантных мышей было обнаружено большее количество лейкоцитов чем у C57BL/6 (Mann-Whitney U-test $Z=2,19$ $p < 0,05$; Рисунок 3.1Г), а количество полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) не отличалось. Таким образом, гистологический анализ ткани толстой кишки выявил признаки хронического воспаления у мышей *Muc2^{-/-}*.

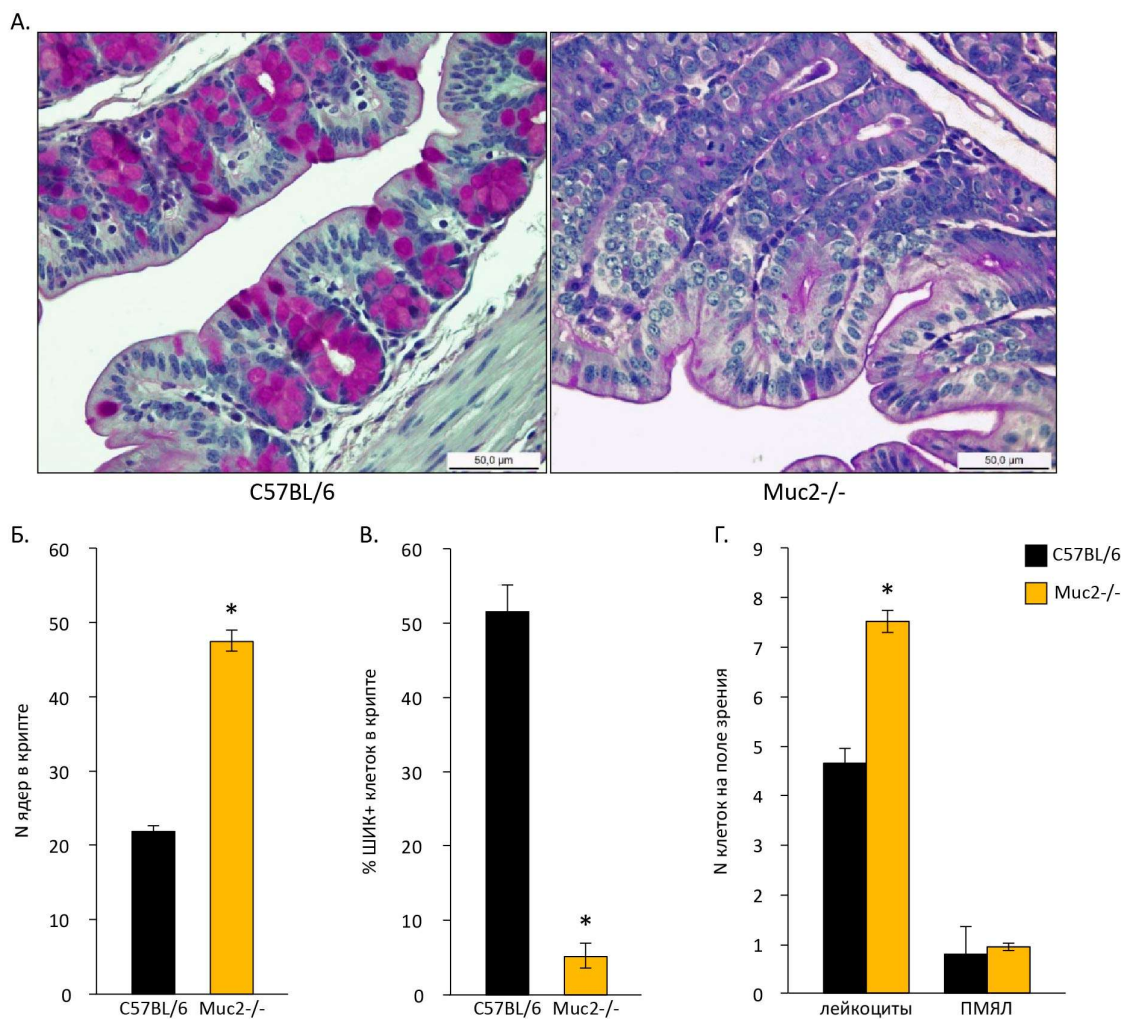


Рисунок 3.1 – Анализ гистологических срезов толстой кишки мышей. А. Фотографии препаратов, окрашенных на ШИК-реакцию, увеличение $\times 400$. Б. Количественная оценка гиперплазии крипт. В. Процент ШИК⁺-клеток в крипте. Г. Количество лейкоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) на срезах толстой кишки. Количество мышей в группе: для Б, В – $n(\text{C57BL/6}) = 4$, $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 4$; для Г – $n(\text{C57BL/6}) = 3$, $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 6$.

* - $p < 0,05$; Mann-Whitney U-test

3.1.2. В ткани толстой кишки *Muc2*^{-/-} мышей увеличена экспрессия факторов воспаления

Для того чтобы оценить характер воспаления в кишечнике у мышей, была определена экспрессия генов некоторых иммунных факторов. Экспрессию генов в образцах ткани восходящего отдела толстой кишки определяли по уровню мРНК целевого гена, нормированному на мРНК гена бета-тубулина (*Tbb5*). Было показано, что у мышей *Muc2*^{-/-} повышена экспрессия гена одного из компонентов мукусного

барьера – trefoil factor 3 (*Tff3*) (Mann-Whitney U-test $Z=2,63$ $p < 0,01$ по сравнению с C57BL/6; Рисунок 3.2). Белок Tff3 выделяется бокаловидными клетками, играет важную роль в защите и восстановлении эпителия кишечника при повреждениях (Kim and Ho, 2010). Анализ экспрессии генов некоторых цитокинов показал, что у мутантных животных в толстой кишке повышена экспрессия *Tnf* и *Il1b* (Mann-Whitney U-test $Z=2,63$ $p < 0,01$ и $Z=2,12$ $p < 0,05$ соответственно, Рисунок 3.2), а экспрессия *Tgfb1* и *Il6* не отличалась от C57BL/6. Также было показано, что экспрессия генов транскрипционных факторов Т-клеток *Rorc* и *Foxp3* у *Muc2^{-/-}* мышей выше, чем у C57BL/6 (Mann-Whitney U-test $Z=2,34$ и $Z=2,19$ соответственно, $p < 0,05$; Рисунок 3.2), а экспрессия *Tbx21* не отличалась от C57BL/6. Помимо этого была исследована экспрессия генов двух основных ферментов метаболизма макрофагов – NO-синтазы2 и аргиназы1 (*Nos2* и *Arg1*), а также фермента простагландин-эндопероксид синтазы2 (*Ptgs2* – также известен, как циклооксигеназа2), вовлеченного в воспалительные реакции. У мутантных мышей было обнаружено повышение экспрессии *Arg1* и *Ptgs2* (Mann-Whitney U-test $Z=2,63$ $p < 0,01$ и $Z=2,34$ $p < 0,05$ соответственно, Рисунок 3.2), а экспрессия *Nos2* не отличалась от C57BL/6. Экспрессия *Arg1* характерна для макрофагов M2 типа, которые играют важную роль в процессах восстановления ткани при повреждениях (Sharouri-Moghaddam et al., 2018).

Таким образом, в кишечнике у мутантных мышей была повышена экспрессия про- и противовоспалительных факторов, что согласуется с результатами гистологического анализа. Повышение у мутантных мышей экспрессии генов *Arg1* и *Tff3*, вероятно, происходит в связи с необходимостью постоянного восстановления поврежденной ткани в кишечнике с нарушенной барьерной функцией.

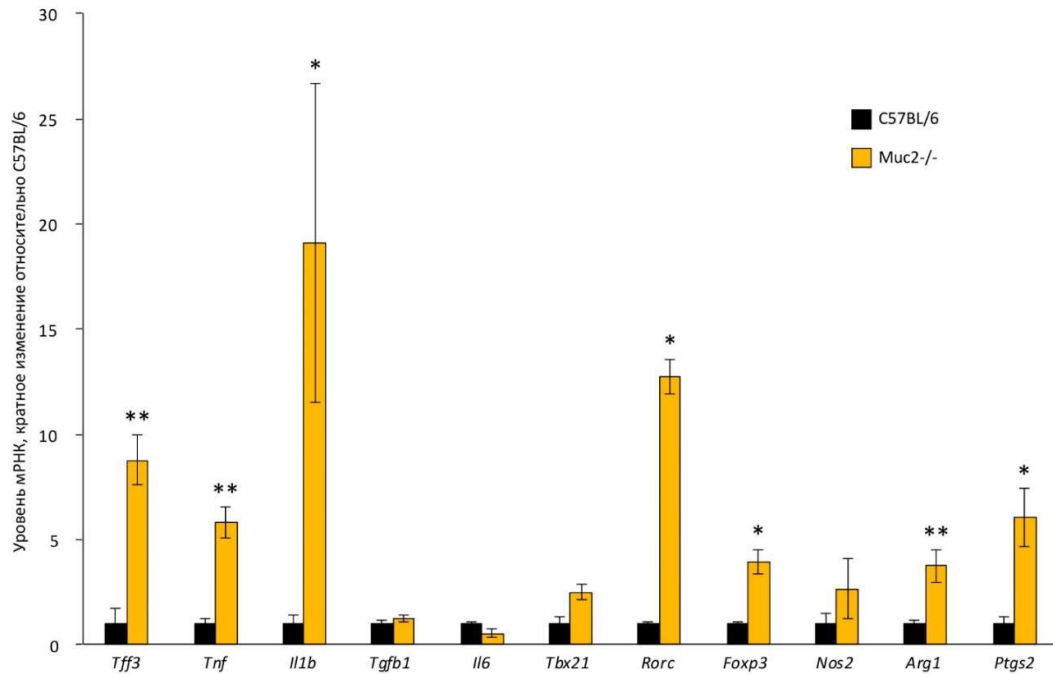


Рисунок 3.2 – Экспрессия генов в ткани толстой кишки *Muc2^{-/-}* мышей, кратное изменение относительно C57BL/6 (относительное количество мРНК целевого гена, нормировано на мРНК *Tbb5*, уровень мРНК у C57BL/6 принят за единицу). Количество мышей в группе: n(C57BL/6)=4, n(*Muc2^{-/-}*)=8. *, ** - p < 0,05; p < 0,01; Mann-Whitney U-test

3.1.3. В крови у мышей *Muc2^{-/-}* мышей повышен уровень IgG против собственной микрофлоры

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^{-/-}* мышей было больше IgG в толстой кишке по сравнению с C57BL/6 (Mann-Whitney U-test $Z=2,63$ p < 0,01; Рисунок 3.3А), при этом количество IgA не отличалось. Помимо этого, в крови у *Muc2^{-/-}* мышей было обнаружено больше IgG против собственной кишечной микрофлоры, чем у C57BL/6 (Mann-Whitney U-test $Z=2,29$ p < 0,05; Рисунок 3.3Б). Таким образом, иммунная система мутантных мышей реагирует на тесный контакт с кишечной микрофлорой увеличением IgG в кишечнике и в крови.

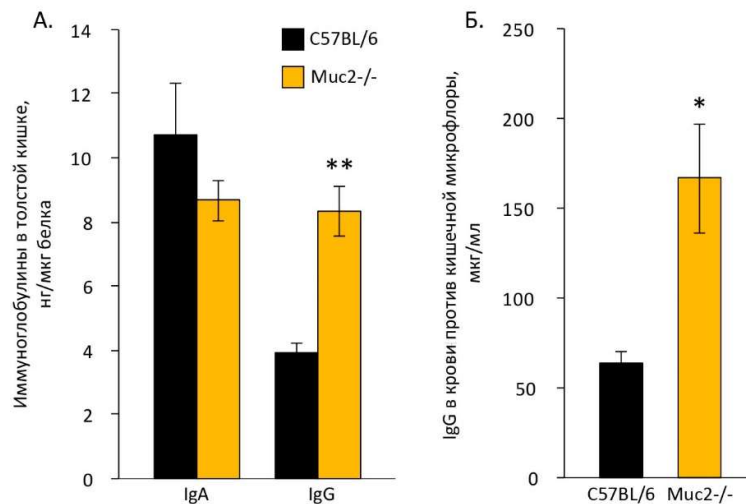


Рисунок 3.3 – Количество иммуноглобулинов в толстой кишке и крови мышей. А. Количество IgA и IgG в толстой кишке мышей. Б. Количество IgG против собственной кишечной микрофлоры в крови мышей. Количество мышей в группе: для IgA – n(C57BL/6) =6, n(Muc2^{-/-}) =8; для IgG – n(C57BL/6) =4, n(Muc2^{-/-}) =8.
*, ** - p <0,05; p <0,01; Mann-Whitney U-test

3.1.4. В толстой кишке у *Muc2^{-/-}* мышей снижено количество связанной с белком фукозы

Фукоза – один из моносахаридов, входящих в состав гликопротеина муцина2 (Bergstrom and Xia, 2013), отсутствие наработки этого гликопротеина, вероятно, приводит к дефициту данного моносахарида в кишечнике. И действительно, анализ количества фукозы в толстой кишке показал, что у *Muc2^{-/-}* мышей было меньше связанной с белком фукозы, чем у C57BL/6 (Mann-Whitney U-test $Z=2,16$ p <0,05; Рисунок 3.4), при этом количество свободной фукозы не различалось между двумя линиями мышей.

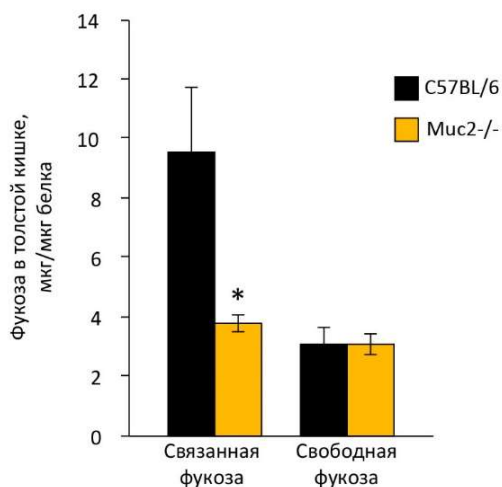


Рисунок 3.4 – Количество фукозы в толстой кишке у мышей. Количество мышей в группе: $n(\text{C57BL/6}) = 4$, $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 4$; * - $p < 0,05$; Mann-Whitney U-test

3.2. Влияние антибиотиков и L-фукозы на микрофлору мышей *Muc2*^{-/-} и C57BL/6 (Эксперимент №2)

Сравнение *Muc2*^{-/-} мышей и C57BL/6 выявило ряд особенностей иммунного статуса в условиях нарушенной барьерной функции в кишечнике. Для того чтобы оценить реакцию мышей на обеднение микрофлоры, их в течение двух недель поили антибиотиками широкого спектра действия (смесь кларитромицина, амоксициллина и метронидазола). Помимо этого, мы попытались скорректировать обеднение микрофлоры, вызванное антибиотиками, добавлением дефицитного у мутантных мышей моносахарида L-фукозы. Известно, что фукоза и содержащие ее вещества могут оказывать влияние на микрофлору, с том числе и при дисбиозах (Borisova et al., 2020; Ke et al., 2020; Liu et al., 2018; Shang et al., 2016).

3.2.1. Прием антибиотиков вызывал истощение и гибель *Muc2*^{-/-} мышей

Прием антибиотиков приводил к гибели *Muc2*^{-/-} мышей, но не C57BL/6 (Fisher exact test $p < 0,05$; Рисунок 3.5А), среди *Muc2*^{-/-} мышей выживали лишь 64,3% (9 из 14), а C57BL/6 демонстрировали 100% выживаемость после приема антибиотиков в течение двух недель (12 из 12). В то же время, добавление L-фукозы в питьевую воду способствовало выживанию 100% мутантных мышей (10 из 10), данный результат

оказался близок к статистически значимому при сравнении с мышами, получавшими антибиотики (Fisher exact test $p=0,053$; Рисунок 3.5А). Прием антибиотиков оказывал эффект на массу тела мышей (Repeated measures ANOVA: эффект межгруппового, внутригруппового и взаимодействия факторов $p < 0,001$; Рисунок 3.5В). Прием антибиотиков приводил к большему снижению массы тела *Muc2^{-/-}* мышей по сравнению с C57BL/6 (Рисунок 3.5В). При этом, начиная с 12го дня эксперимента, масса тела мутантных мышей, получавших антибиотики «*Muc2^{-/-}+АБ*» была ниже, чем у мышей, получавших антибиотики с L-фукозой «*Muc2^{-/-}+АБ/Ф*» (Рисунок 3.5В).

На 15й день эксперимента на показатель изменения массы тела относительно 1го дня был обнаружен эффект экспериментальной группы (Kruskal-Wallis test $H(2,19)=14,66$ $p < 0,001$). Этот показатель в среднем принимал отрицательные значения в группах мутантных мышей и отличался от группы «C57BL/6+АБ» (Mann-Whitney U-test $Z=3,03$ $p < 0,01$ и $Z=2,56$ $p < 0,05$; Рисунок 3.5Б). Потеря массы тела в группе «*Muc2^{-/-}+АБ*» составляла в среднем 16% от первоначальной массы, в то время как в группе «*Muc2^{-/-}+АБ/Ф*» этот показатель был лишь 3% (Mann-Whitney U-test $Z=2,46$ $p < 0,05$ между группами; Рисунок 3.5Б). Таким образом, антибиотики вызывали истощение и гибель мутантных мышей, а добавление L-фукозы отменяло этот эффект.

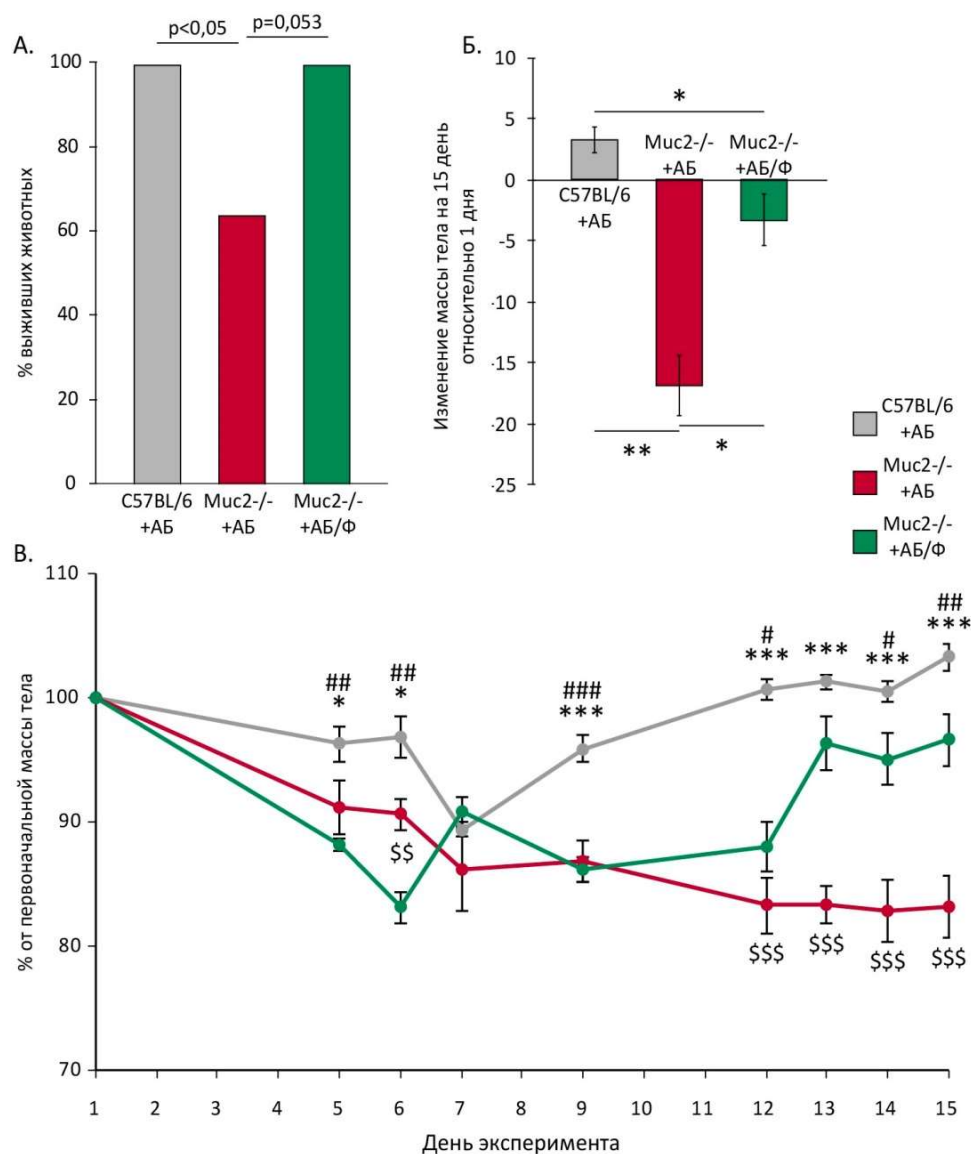


Рисунок 3.5 – Выживание и изменение массы тела мышей. А. Процент выживших мышей. Для межгруппового сравнения использован Fisher exact test. Б. Изменение массы тела мышей на 15 день эксперимента относительно 1 дня. *, ** - $p < 0,05$; $p < 0,01$; Mann-Whitney U-test. Количество мышей в группе: $n(\text{C57BL}/6+\text{АБ})=8$; $n(\text{Muc}2^{-/-}+\text{АБ})=6$; $n(\text{Muc}2^{-/-}+\text{АБ}/\Phi)=5$

В. Динамика изменения массы тела мышей относительно первоначальной массы.

*, *** - $p < 0,05$; $p < 0,001$; различия между «C57BL/6+АБ» и «Muc2-/-+АБ»;
 #, ##, ### - $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; различия между «C57BL/6+АБ» и «Muc2-/-+АБ/Ф»;
 \$\$, \$\$\$ - $p < 0,01$; $p < 0,001$; различия между «Muc2-/-+АБ» и «Muc2-/-+АБ/Ф»;

Fisher LSD test

3.2.2. Прием антибиотиков приводил к обеднению бактериальной микрофлоры кишечника мышей

Изменение кишечной микрофлоры оценивали по количеству бактерий в фекалиях, которое определяли по количеству бактериальной 16S rRNA ДНК относительно 28S rRNA ДНК мыши. Был выявлен эффект экспериментальной группы на общее количество бактерий как у *Muc2^{-/-}* мышей, так и у C57BL/6 (Kruskal-Wallis test $H(2,18)=10,74$ и $H(2,15)=10,72$ соответственно, $p < 0,01$). Антибиотики вызывали снижение количества бактерий у мышей обоих генотипов (Mann-Whitney U-test $Z=2,92$ и $Z=2,55$ соответственно, $p < 0,01$; Рисунки 3.6А и 3.7А). Бактерии широко распространенной группы симбионтов *Bacteroides* spp. не детектировались после приема антибиотиков у мышей обеих линий (Fisher exact test $p < 0,01$; Рисунки 3.6Б и 3.7Б). Также был выявлен эффект группы на симбиотические бактерии *Lactobacillus* spp. у *Muc2^{-/-}* мышей (Kruskal-Wallis test $H(2,18)=12,49$; $p < 0,01$). Антибиотики значительно снижали количество этих бактерий у мутантных мышей (Mann-Whitney U-test $Z=2,92$ $p < 0,01$; Рисунок 3.6В), а у C57BL/6 после антибиотиков эти бактерии вовсе не детектировались (Fisher exact test $p < 0,01$; Рисунок 3.7В). Также отмечалось уменьшение количества особей *Muc2^{-/-}*, у которых после антибиотиков детектировалась инфекция *Helicobacter* spp. (Fisher exact test $p < 0,05$; Рисунок 3.6Г). У мышей C57BL/6 данная инфекция не детектировалась и до начала приема антибиотиков.

Добавление к антибиотикам L-фукозы приводило к восстановлению общего количества бактерий и *Lactobacillus* spp. у *Muc2^{-/-}* мышей (Mann-Whitney U-test $Z=2,46$ $p < 0,05$ и $Z=2,64$ $p < 0,01$ соответственно, по сравнению с группой «+АБ», Рисунки 3.6А и 3.6В) и *Bacteroides* spp. (Fisher exact test $p < 0,01$ по сравнению с группой «+АБ», Рисунок 3.6Б). Также наблюдалась тенденция на восстановление инфекционного агента *Helicobacter* spp. у *Muc2^{-/-}* мышей (Fisher exact test $p = 0,06$ по сравнению с группой «+АБ», Рисунок 3.6Г). На микрофлору мышей C57BL/6 добавление L-фукозы оказывало несколько иной эффект. У этих животных при добавлении моносахарида восстанавливалось лишь общее количество бактерий (Mann-Whitney U-test $Z=2,55$ $p < 0,01$ по сравнению с группой «+АБ», Рисунок 3.7А) и *Lactobacillus* spp. (Fisher exact test $p < 0,01$; Рисунок 3.7В), но не бактерии *Bacteroides* spp. Таким образом, добавление L-фукозы частично корректировало нарушения микрофлоры, вызванные антибиотиками.

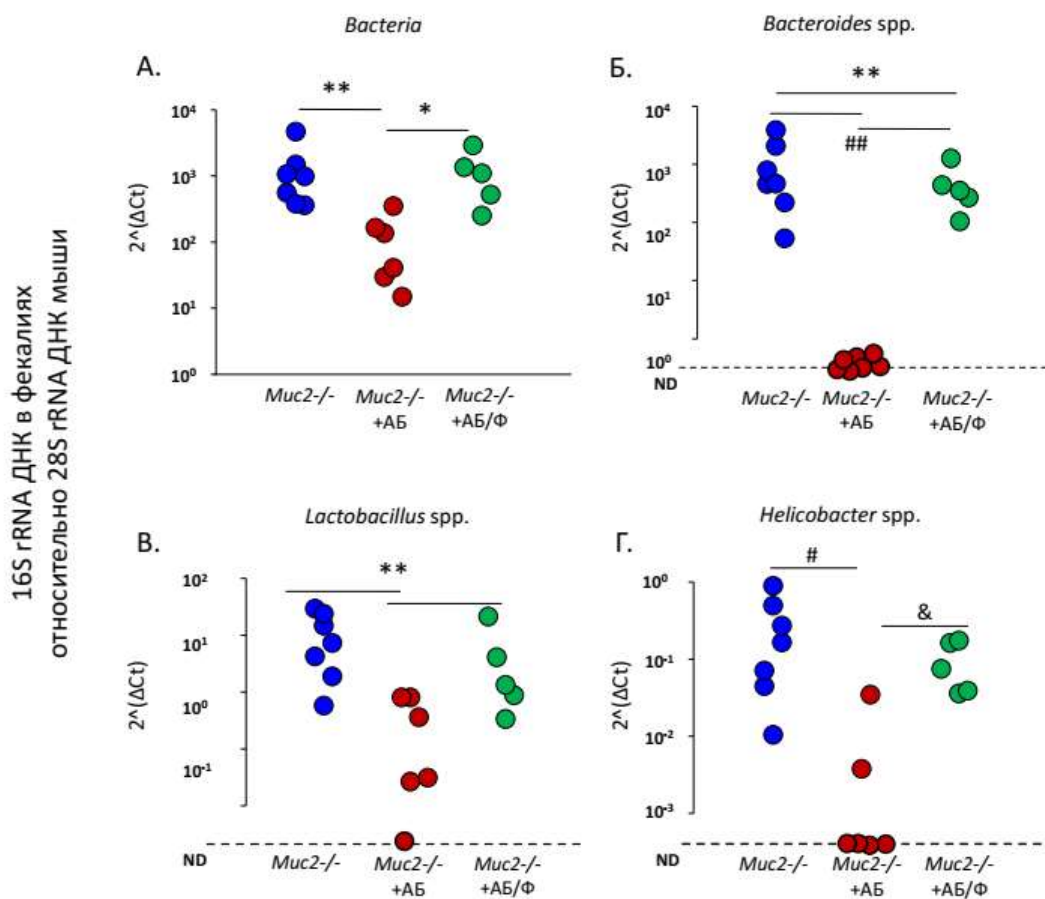


Рисунок 3.6 – Количество бактериальной ДНК в фекалиях $Muc2^{-/-}$ мышей (относительно 28S rRNA ДНК мыши). ND – количество ДНК ниже уровня детекции. А. Количество общей бактериальной ДНК 16S rRNA. Б. Количество ДНК 16S rRNA *Bacteroides* spp. В. Количество ДНК 16S rRNA *Lactobacillus* spp. Г. Количество ДНК 16S rRNA *Helicobacter* spp.

Количество мышей в группе: $n(Muc2^{-/-})=7$; $n(Muc2^{-/-}+AB)=6$; $n(Muc2^{-/-}+AB/\Phi)=5$.

*, ** - $p < 0,05$; $p < 0,01$; Mann-Whitney U-test

#, ## - $p < 0,05$; $p < 0,01$; & - $p = 0,06$; Fisher exact test

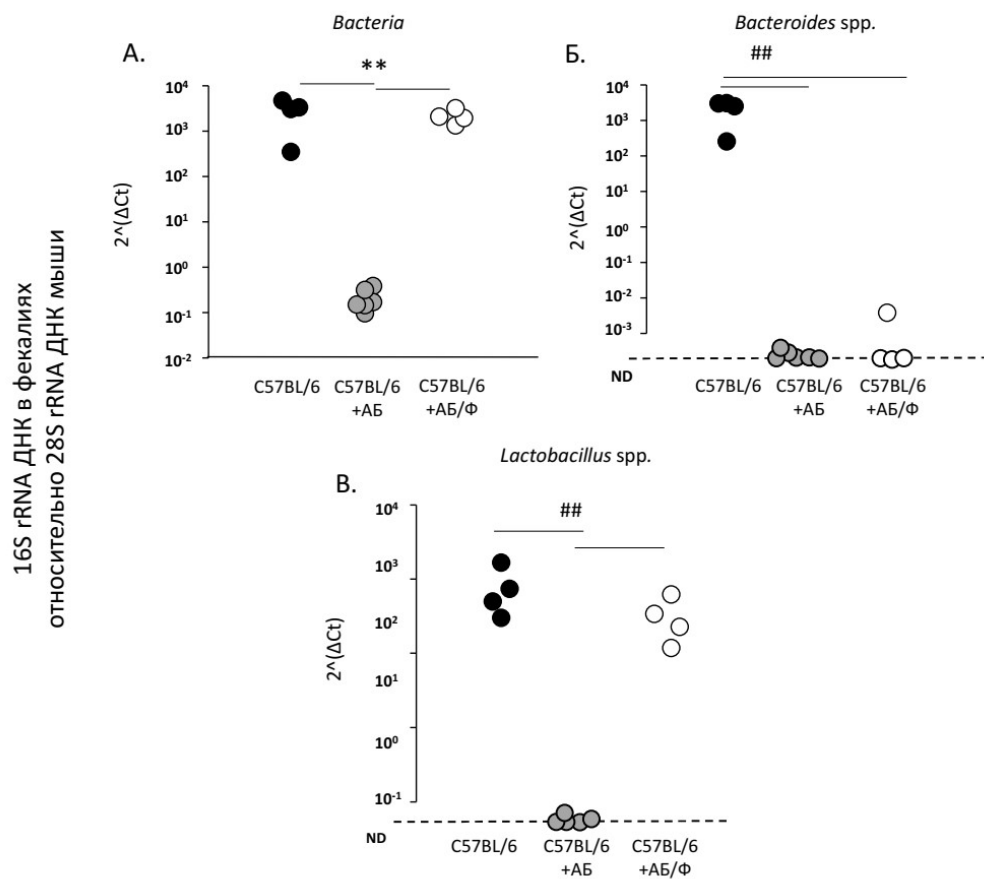


Рисунок 3.7 – Количество бактериальной ДНК в фекалиях мышей C57BL/6 (относительно 28S rRNA ДНК мыши). ND – количество ДНК ниже уровня детекции. А. Количество общей бактериальной ДНК 16rRNA. Б. Количество ДНК 16S rRNA *Bacteroides* spp. В. Количество ДНК 16S rRNA *Lactobacillus* spp. Количество мышей в группе: $n(\text{C57BL/6}) = 4$; $n(\text{C57BL/6} + \text{AB}) = 6$; $n(\text{C57BL/6} + \text{AB}/\Phi) = 4$. ** - $p < 0,01$; Mann-Whitney U-test; ## - $p < 0,01$ Fisher exact test

3.2.3. В кишечнике *Muc2*^{-/-} мышей был обнаружен микроорганизм *Tritrichomonas* sp.

В другом эксперименте по получению культуры бактерии *Helicobacter* spp., проводившимся совместно с коллегами из СФНЦА РАН, было обнаружено, что у мышей *Muc2*^{-/-} с инфекцией детектируется простейший микроорганизм, который по морфологическим признакам похож на представителя *Tritrichomonas* spp. (микрофотография представлена в Приложении №2) В связи с этим, образцы ДНК из фекалий *Muc2*^{-/-} мышей были исследованы на наличие ДНК этой группы простейших.

При помощи праймеров к ДНК 18S rRNA *Tritrichomonas* spp. (Dimasuy and Rivera, 2013) был получен и отсеквенирован фрагмент ДНК обнаруженного микроорганизма.

Полученная последовательность (Tsp1019 MT804340) была проанализирована при помощи программы BLASTN, а затем был проведен филогенетический анализ. Филогенетический анализ подтвердил близкое родство обнаруженного микроорганизма, к видам *Tritrichomonas*, при этом самым филогенетически близким оказались *Tritrichomonas* sp. strain L55, *Tritrichomonas muris* и *Tritrichomonas musculus* (*Tritrichomonas* sp. MEG-2016a) (Рисунок 3.8). Таким образом, в кишечнике мышей *Muc2^{-/-}* была не только инфекция *Helicobacter* spp., но и микроорганизм *Tritrichomonas* sp. (который обнаруживался и у мышей, принимавших антибиотики). Присутствие инфекций в условиях нарушенного барьера и нарушения микрофлоры в кишечнике могло быть причиной сильного истощения и гибели мутантных мышей от антибиотиков.

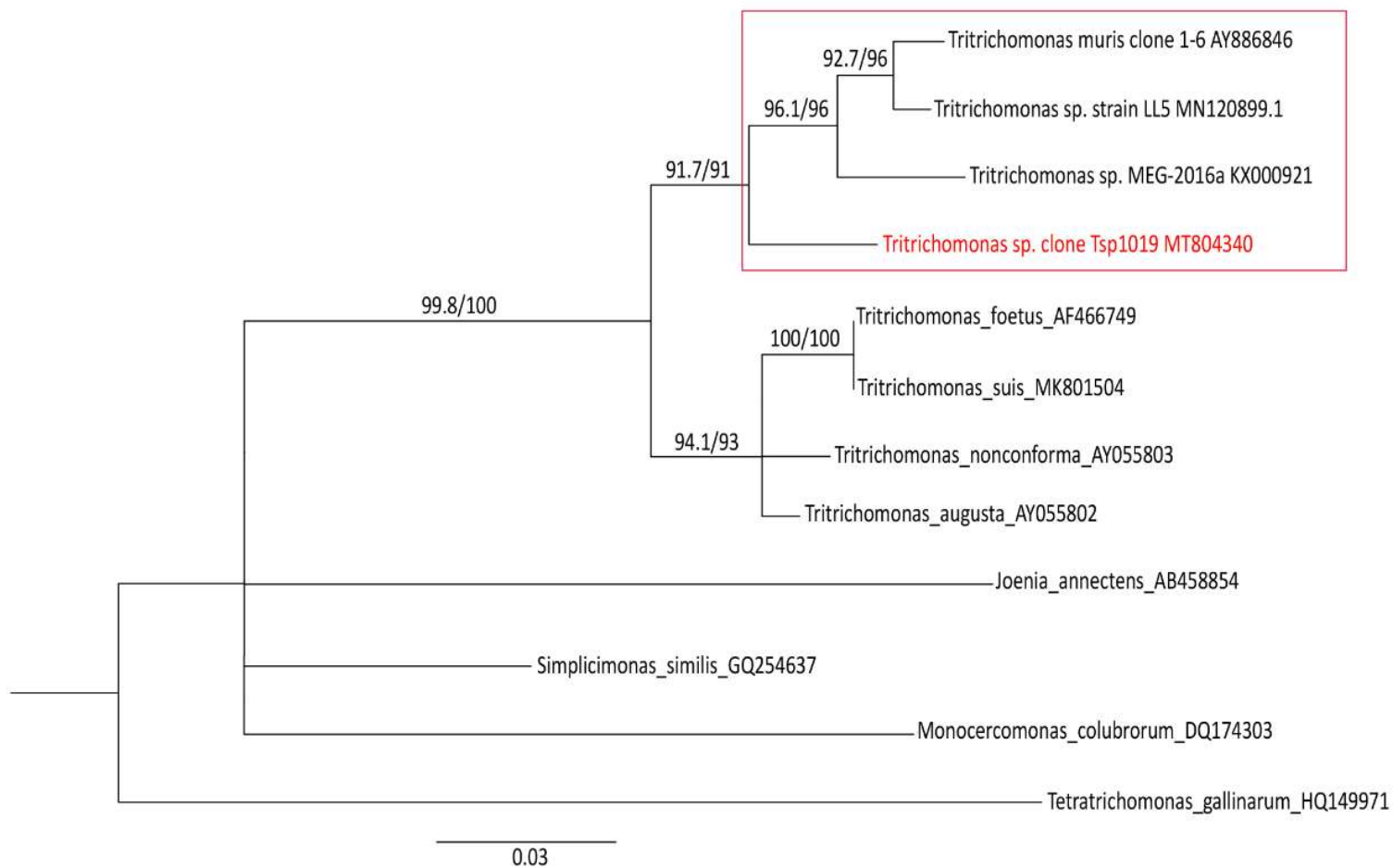


Рисунок 3.8 – Филогенетический анализ отсеквенированной последовательности ДНК 18S rRNA *Tritrichomonas* sp. clone Tsp1019 MT804340, обнаруженной в фекалиях *Muc2*^{-/-} мышей

3.3. Влияние антибиотиков на микрофлору *Muc2^{-/-}* мышей, свободных от инфекций (Эксперимент №3)

3.3.1. Мыши *Muc2^{-/-}*, свободные от инфекций, не погибали от антибиотиков

Поскольку у мышей *Muc2^{-/-}*, демонстрирующих гибель от антибиотиков, обнаружались инфекции *Helicobacter* spp. и *Tritrichomonas* sp., мы решили оценить вклад присутствия этих микроорганизмов в наблюдаемый эффект. Для этого мы использовали мышей *Muc2^{-/-}* (и *Muc2^{+/+}* в качестве контроля), очищенных от инфекции *Helicobacter* spp. при помощи редеривации (у мышей также не детектировался микроорганизм *Tritrichomonas* sp.). При этом случаев гибели от антибиотиков у мышей *Muc2^{-/-}* (а также у *Muc2^{+/+}*), свободных от инфекций, не было зафиксировано в двух независимых экспериментах (количество животных в группе было n=5 в каждом эксперименте).

3.3.2. Антибиотики обедняли бактериальную микрофлору кишечника мышей, свободных от инфекций

Анализ бактерий в фекалиях мышей, свободных от инфекций, показал эффект антибиотиков на общее количество бактерий, а также *Bacteroides* spp. (Kruskal-Wallis test $H(1,24)=17,28$ $p < 0,001$) и *Lactobacillus* spp. (Kruskal-Wallis test $H(1,24)=10,83$ $p < 0,001$). При приеме антибиотиков общее количество бактериальной ДНК и *Bacteroides* spp. в фекалиях мышей *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}* снижалось (Mann-Whitney U-test $Z=3,06$ $p < 0,01$ и $Z=2,50$ $p < 0,05$ по сравнению с контролем, Рисунки 3.9А и 3.9Б). Снижение количества *Lactobacillus* spp. наблюдалось только у мутантных мышей (Mann-Whitney U-test $Z=3,06$ $p < 0,01$ Рисунок 3.9В). Таким образом, обеднение бактериальной микрофлоры в отсутствие инфекций не вызывало гибели мутантных мышей.

Интересно, что в отличие от эксперимента №2, в данном эксперименте у мышей, свободных от инфекций, после антибиотиков *Bacteroides* spp. снижались, но оставались на детектируемом уровне. Также стоит отметить, что реакция микрофлоры мышей *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}* на антибиотики была очень похожей. В связи с этим в последующих экспериментах мы использовали мышей *Muc2^{-/-}* и их однопометников *Muc2^{+/+}* в качестве контроля.

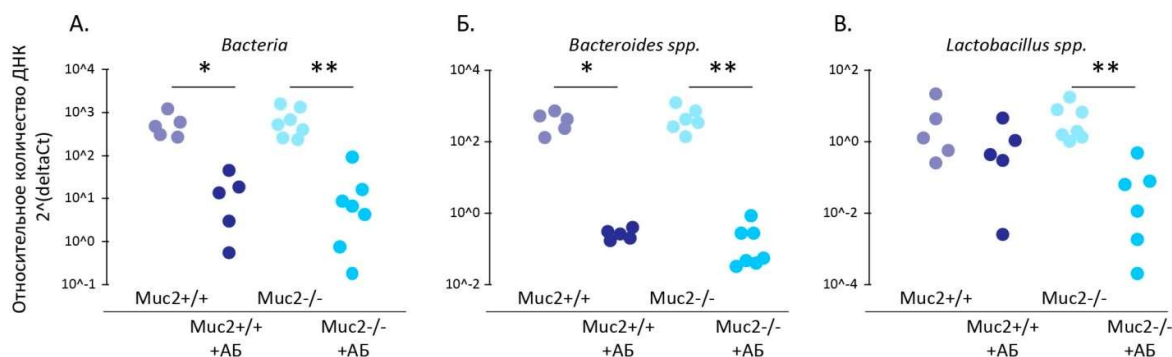


Рисунок 3.9 – Количество бактериальной ДНК в фекалиях мышей свободных от инфекции (относительно 28S rRNA ДНК мыши). А. Количество общей бактериальной ДНК 16rRNA. Б. Количество ДНК 16S rRNA *Bacteroides* spp. В. Количество ДНК 16S rRNA *Lactobacillus* spp. Количество мышей в группе: n(Muc2+/+) = 5; n(Muc2+/+/АБ) = 5; n(Muc2-/-) = 7; n(Muc2-/-/АБ) = 7. *, ** - p < 0,05; p < 0,01; Mann-Whitney U-test

3.4. Влияние врожденной инфекции на иммунный статус мышей *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{+/+} (Эксперимент №4)

В предыдущих экспериментах было обнаружено, что истощение и гибель при приеме антибиотиков наблюдалась лишь у *Muc2*^{-/-} мышей, рожденных с инфекциями. Известно, что микрофлора оказывает значительное влияние на формирование иммунной системы и установления гомеостаза в кишечнике (Grigg and Sonnenberg, 2017). При этом в условиях нарушения барьерной функции вклад микрофлоры в физиологию организма-хозяина может быть еще больше. В связи с этим, мы сравнили некоторые показатели иммунной системы мышей *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{+/+} с инфекциями и без.

3.4.1. Получение мышей от гетерозиготного скрещивания способствовало выравниванию микрофлоры *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{+/+} мышей

В данном и последующих экспериментах, для того чтобы минимизировать материнские эффекты на микрофлору и иммунную систему, были использованы мыши, полученные от скрещивания мышей *Muc2*^{+/-}. Чтобы определить, произошло ли выравнивание микрофлоры, был проведен качественный анализ бактериального состава микрофлоры мышей, рожденных с инфекциями и без. Анализ конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК 16S rRNA показал, что микрофлора животных всех групп была очень похожа (практически все сигналы ДНК совпадали, Рисунок 3.10). При этом следует отметить, что такой

подход выявляет наиболее представленные виды бактерий, но не исключает различий в количественной представленности отдельных видов.

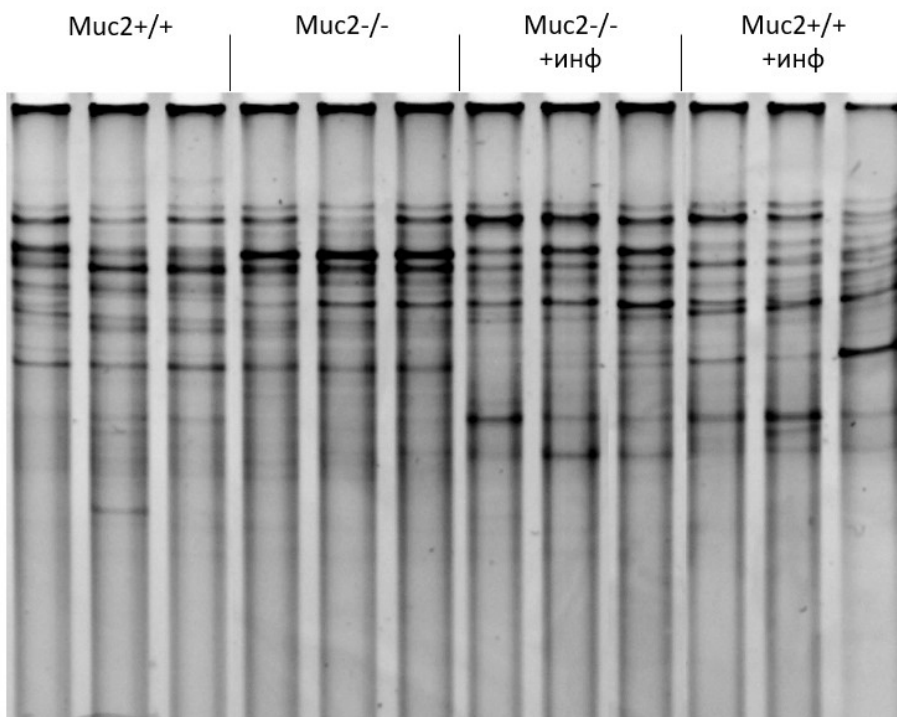


Рисунок 3.10 – Качественный анализ бактериального состава микрофлоры (SSCP ДНК 16S rRNA) в фекалиях у мышей *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}*, рожденных с инфекцией и без нее.

3.4.2. У мышей *Muc2^{-/-}* мышей, рожденных с инфекциями и без, повышена проницаемость кишечника

Отсутствие гликопротеина муцин2 в кишечнике приводит к повышению проницаемости кишечника у мышей *Muc2^{-/-}* (Borisova, Achasova, et al., 2020). При этом известно, что микрофлора, в том числе и протозойные инфекции, также могут оказывать влияние на проницаемость кишечника (Jakobsson et al., 2015; Scott et al., 2002). Анализ проницаемости кишечника мышей *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}* выявил эффект группы (Kruskal-Wallis test $H(1,16)=8,47$ $p < 0,01$). Через 4 часа после внутрижелудочного введения концентрация FITC-декстрана в крови у *Muc2^{-/-}* мышей, независимо от присутствия инфекции, была выше, чем у мышей дикого типа (Mann-Whitney U-test $Z=2,32$ и $Z=2,55$ $p < 0,05$; Рисунок 3.11). Однако, различий по проницаемости кишечника у мутантных мышей с разным микробиологическим статусом выявлено не было. Таким образом, отсутствие

наработки муцина2 приводило к увеличению проницаемости кишечника, а присутствие инфекций не влияло на этот показатель.

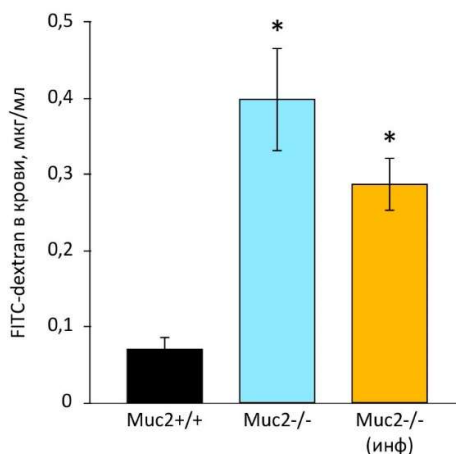


Рисунок 3.11 – Проницаемость кишечника *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}* мышей, определенная по количеству FITC-декстрана, попавшего в кровь через кишечник. Количество мышей в группе: n(*Muc2^{+/+}*) =4; n(*Muc2^{-/-}*) =5, n(*Muc2^{-/-}*+инф) =7. * - p <0,05 по сравнению с *Muc2^{+/+}*; Mann-Whitney U-test

3.4.3. Мыши с нормальной барьерной функцией (*Muc2^{+/+}*) оказались устойчивы к колонизации *Tritrichomonas* sp.

Количественный анализ *Tritrichomonas* sp. в фекалиях выявил, что у мышей *Muc2^{+/+}* с нормальной барьерной функцией колонизация микроорганизмами была значительно снижена по сравнению с мутантными однопометниками (Fisher Exact Test p<0,05; Рисунок 3.12). Таким образом, наличие муцина2 способствовало защите от колонизации простейших.

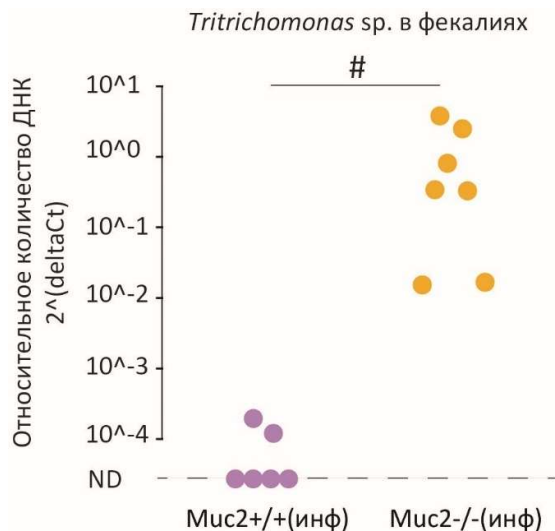


Рисунок 3.12 – Количество ДНК *Tritrichomonas* sp. (относительно ДНК 28S rRNA мыши) в фекалиях однопометников *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}*. ND – количество ДНК ниже уровня детекции. # - $p < 0,05$; Fisher Exact Test

3.4.4. Инфекции влияли на регуляторные Т-клетки в мезентериальных лимфатических узлах (ЛУ) у *Muc2^{-/-}* мышей

Чтобы оценить, какой эффект на иммунную систему оказывает присутствие инфекций в кишечнике с нарушенной барьерной функцией, мы исследовали субпопуляции лимфоцитов в мезентериальных ЛУ мышей. Был обнаружен эффект группы на клеточность мезентериальных ЛУ (Kruskal-Wallis test $H(3,25)=16,08$ $p < 0,01$). Клеточность ЛУ мутантных мышей без инфекции была выше, чем у мышей *Muc2^{-/-}* с инфекциями, а также чем у мышей дикого типа соответствующего микробиологического статуса (Mann-Whitney U-test $Z=3,03$ и $Z=2,85$ $p < 0,01$; Рисунок 3.13А). Аналогичный эффект наблюдался для количества лимфоцитов субпопуляций $CD19^+$, $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ (данные представлены в Приложении №7).

Исследование субпопуляций регуляторных Т-клеток выявило эффект группы на процент $CD25^+Foxp3^+$ -клеток среди $CD4^+$ (Kruskal-Wallis test $H(3,24)=9,15$ $p < 0,05$). Процент таких клеток у *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями был выше, чем у мутантных мышей без инфекций (Mann-Whitney U-test $Z=2,78$ $p < 0,01$; Рисунок 3.13Б). При этом увеличение количества таких клеток, вероятно, происходило за счет увеличения экспрессии белка Foxp3 в $CD4^+$ -клетках (эффект группы Kruskal-Wallis test $H(3,24)=9,47$ $p < 0,05$). Процент $CD4^+Foxp3^+$ -клеток среди лимфоцитов был выше у мутантных мышей с инфекциями, по сравнению с мышами без инфекций (Mann-Whitney U-test $Z=2,92$ $p < 0,01$ Рисунок 3.13Б). В то же время на процент $CD4^+CD25^+$ -клеток такого эффекта не было обнаружено.

Таким образом, присутствие инфекций у мутантных мышей было ассоциировано с увеличением в мезентериальных ЛУ процента регуляторных Т-клеток, обеспечивающих противовоспалительные реакции в кишечнике.

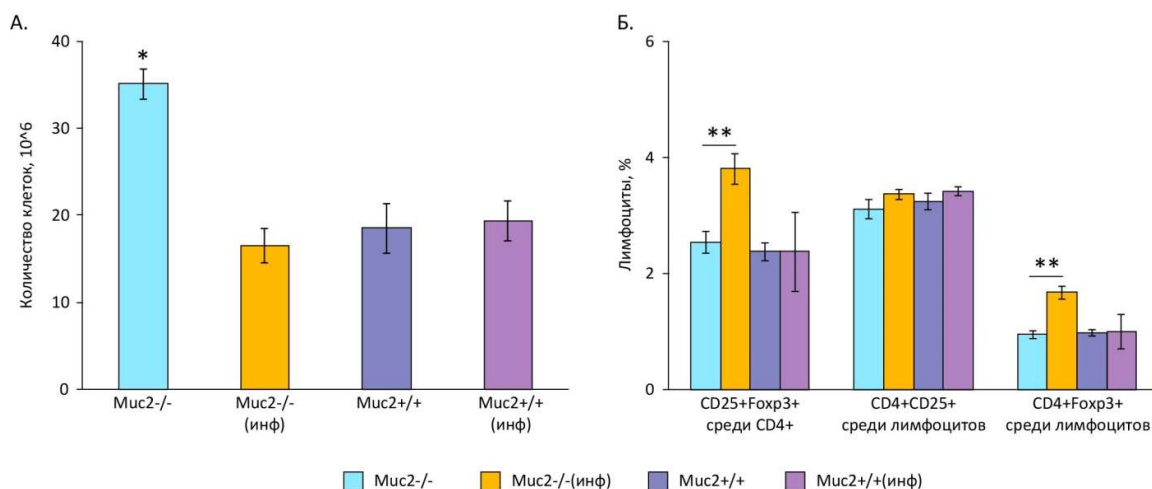


Рисунок 3.13 – Лимфоциты в мезентериальных ЛУ мышей. А. Клеточность лимфоузлов. Б. Процентный состав субпопуляций регуляторных Т-клеток. Количество мышей в группе: $n(\text{Muc2}^{-/-})=6$, $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф})=7$, $n(\text{Muc2}^{+/+})=5$, $n(\text{Muc2}^{+/+}\text{-инф})=6$

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; Mann-Whitney U-test

3.4.5. Присутствие инфекций было ассоциировано с увеличением CD4^+ Т-клеток в крови $\text{Muc2}^{-/-}$ мышей

Для того чтобы оценить эффект нарушения барьерной функции и присутствия инфекции на системном уровне, были исследованы клетки крови. Был обнаружен эффект группы на количество $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ -лимфоцитов (Kruskal-Wallis test $H(3,24)=7,86$ $p < 0,05$). У $\text{Muc2}^{-/-}$ мышей с инфекцией этих клеток в крови было больше, чем у мутантных мышей без инфекций (Mann-Whitney U-test $Z=2,27$ $p < 0,05$).

Таблица 3.1 – Количество лейкоцитов и лимфоцитов в крови мышей.

Группа	Лейк., $10^6/\text{мл}$	Лимф., $10^6/\text{мл}$	CD19^+ 10^6	CD3^+ 10^6	$\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ 10^6	$\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ 10^6
$\text{Muc2}^{-/-}$	$9,45 \pm 0,32$	$7,24 \pm 0,23$	$3,96 \pm 0,22$	$1,60 \pm 0,08$	$1,01 \pm 0,07$	$0,50 \pm 0,03$
$\text{Muc2}^{+/+}$	$7,57 \pm 1,14$	$5,85 \pm 0,88$	$3,19 \pm 0,48$	$1,30 \pm 0,26$	$0,82 \pm 0,18$	$0,41 \pm 0,07$
$\text{Muc2}^{-/-}$ (инф.)	$10,32 \pm 0,32$	$7,63 \pm 0,26$	$4,19 \pm 0,13$	$1,82 \pm 0,08$	$1,20 \pm 0,06^*$	$0,51 \pm 0,04$
$\text{Muc2}^{+/+}$ (инф.)	$7,57 \pm 1,10$	$5,85 \pm 0,85$	$3,19 \pm 0,49$	$1,30 \pm 0,12$	$0,82 \pm 0,09$	$0,42 \pm 0,04$

Количество мышей в группе: $n(\text{Muc2}^{-/-})=5$, $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф})=7$, $n(\text{Muc2}^{+/+})=6$, $n(\text{Muc2}^{+/+}\text{-инф})=6$. * - $p < 0,05$ различия между $\text{Muc2}^{-/-}$ с инфекцией и без нее, Mann-Whitney U-test

3.4.6. Отсутствие муцина2 и присутствие инфекций влияли на количество иммуноглобулинов в крови мышей

Анализ иммуноглобулинов в крови выявил эффект генотипа на количество IgG (Kruskal-Wallis test $H(1,24)=10,83$ $p < 0,001$). Концентрация IgG в крови была выше у *Muc2*^{-/-} мышей по сравнению с *Muc2*^{+/+} соответствующего микробиологического статуса (Mann-Whitney U-test $Z=2,16$ $p < 0,05$; Рисунок 3.14). Также был выявлен эффект группы на количество IgA (Kruskal-Wallis test $H(3,24)=14,78$ $p < 0,01$). Концентрация IgA в крови у *Muc2*^{-/-} мышей, свободных от инфекции, и *Muc2*^{+/+} с инфекцией была выше, чем у мышей дикого типа (Mann-Whitney U-test $Z=2,64$ и $Z=2,80$ $p < 0,01$; Рисунок 3.14). Таким образом, полученный эффект генотипа на количество IgG в крови согласуется с данными, полученными при сравнении мышей *Muc2*^{-/-} и C57BL/6 в эксперименте №1. А концентрация IgA в крови повышается как при наличии инфекции, так и при нарушении барьера в кишечнике при отсутствии инфекции.

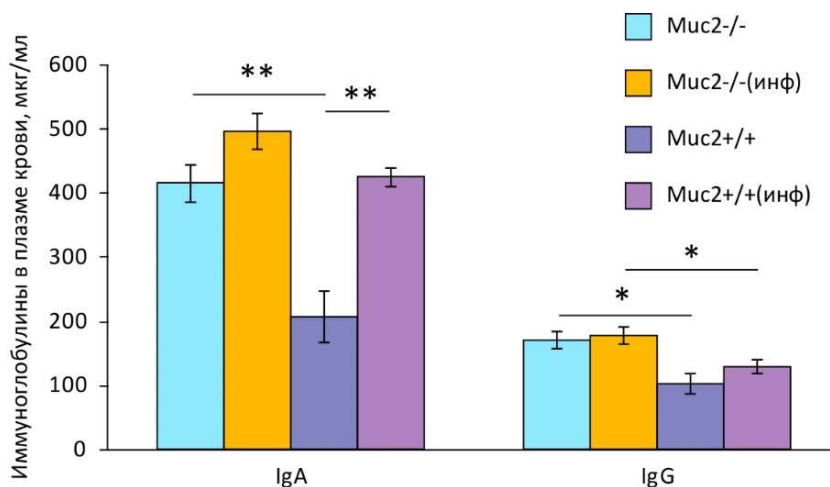


Рисунок 3.14 – Количество IgA и IgG в крови мышей. Количество мышей $n=6$ в каждой группе. *, ** - $p < 0,05$; $p < 0,01$; Mann-Whitney U-test.

3.5. Элиминация *Tritrichomonas* sp. способствовала выживанию *Muc2*^{-/-} мышей при обеднении бактериальной микрофлоры (Эксперимент №5)

Для элиминации инфекций *Helicobacter* spp. и *Tritrichomonas* sp., мышам *Muc2*^{-/-} в течение двух недель предоставляли высокую дозу антибиотиков путем внутрижелудочного введения раз в сутки (Рисунок 3.15А). В данном эксперименте мы, аналогично предыдущим экспериментам, использовали смесь антибиотиков (кларитромицин, амоксициллин, метронидазол), поскольку метронидазол

используют для лечения протозойных инфекций, а том числе и *Tritrichomonas* spp. (Da Costa et al., 2019; Love et al., 2017).

Был обнаружен статистически значимый эффект на массу тела животных (Repeated measures ANOVA: эффекты межгруппового, внутригруппового и взаимодействие факторов $p < 0,001$; Рисунок 3.15Б). При этом антибиотики вызывали снижение массы тела мышей со 2го по 5й день эксперимента, а на 7й день масса мышей восстановилась и не отличалась от контрольной группы. Таким образом, после двухнедельного приема высокой дозы антибиотиков мыши не демонстрировали болезненного поведения и истощения. Такой эффект сочетался со снижением количества ДНК *Tritrichomonas* sp. в фекалиях (Fisher exact test $p < 0,05$; Рисунок 3.15В), при этом количество ДНК *Helicobacter* spp. тоже снижалось, но эти изменения не были статистически значимыми (Рисунок 3.15Г). Таким образом, при угнетении инфекции *Tritrichomonas* sp. терапия антибиотиками не вызывала гибели мутантных мышей. Далее мы решили проверить, будет ли восстановление бактериальной микрофлоры L-фукозой при антибактериальной терапии способствовать выживанию мутантных мышей при недостаточном угнетении *Tritrichomonas* sp.

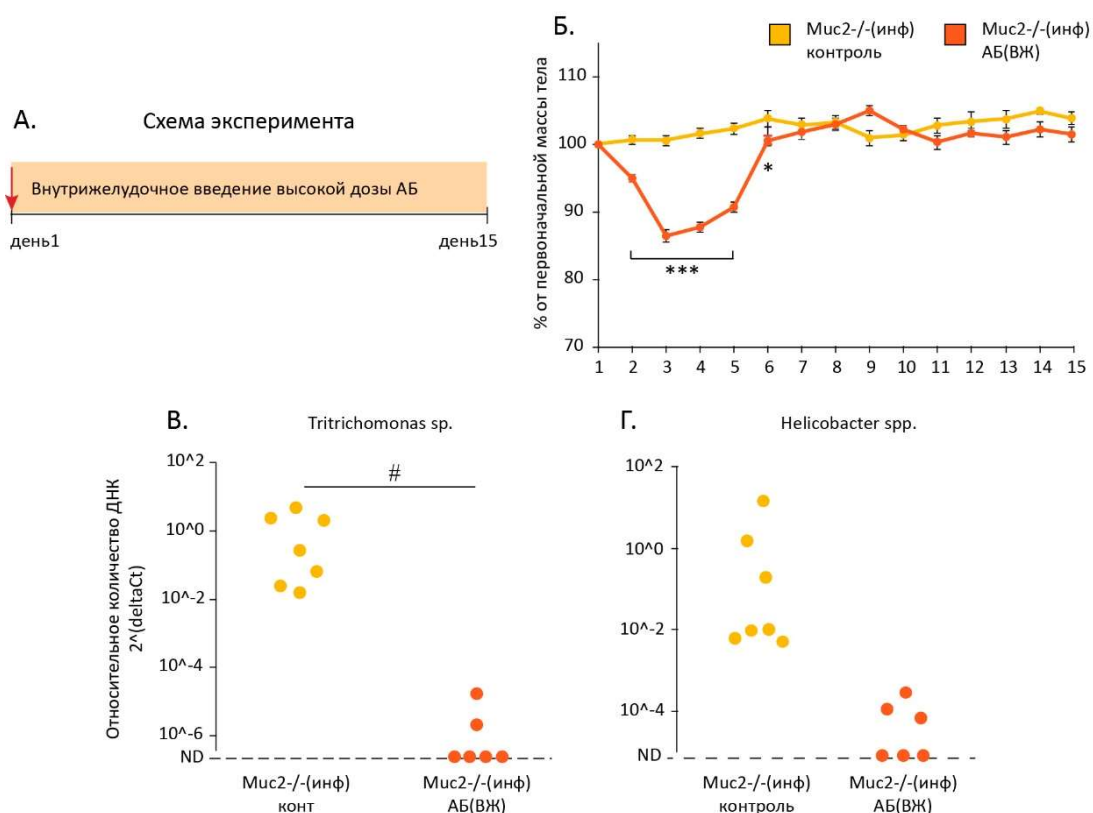


Рисунок 3.15 – Масса тела и микрофлора мышей *Muc2^{-/-}*, рожденных с инфекциями, после воздействия высокой дозой антибиотиков. А. Схема эксперимента. АБ-антибиотики. Б. Изменение массы тела мышей. Количество мышей в группе: n(*Muc2^{-/-}*-инф/конт) =7; n(*Muc2^{-/-}*-инф/АБ-ВЖ) =6 *, *** - p <0,05; p <0,001; Fisher LSD test В. Количество ДНК *Tritrichomonas* sp. в фекалиях мышей (относительно 28S rRNA ДНК мыши). # - p <0,05; Fisher exact test Г. Количество ДНК *Helicobacter* spp. в фекалиях мышей (относительно 28S rRNA ДНК мыши). ND – количество ДНК ниже уровня детекции.

3.6. Влияние антибиотиков и L-фукозы на микрофлору *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}* мышей с инфекциями и без (Эксперимент №6)

Оказалось, что угнетение инфекций при помощи введения высокой дозы антибиотиков внутрижелудочно не вызывает истощения и гибели *Muc2^{-/-}* мышей. Далее мы решили проверить эффект недостаточного угнетения инфекций, а также проверить эффект L-фукозы на восстановление мышей при обеднении бактериальной микрофлоры. Для этого мышам вводили высокую дозу антибиотиков внутрижелудочно в течение 7 дней, а затем антибиотики добавляли в питьевую воду в течение следующих 7 дней. Таким образом, в течение второй недели эксперимента мыши получали низкую дозу антибиотиков. L-фукозу добавляли питьевую воду на протяжении всего эксперимента (схема эксперимента представлена на Рисунке 3.16А).

3.6.1. L-фукоза способствовала восстановлению массы тела *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями при приеме антибиотиков

Было показано, что предоставление антибиотиков и L-фукозы влияло на массу тела мутантных мышей, рожденных с инфекциями (Repeated measures ANOVA: эффекты межгруппового, внутригруппового и взаимодействие факторов p <0,001; Рисунок 3.16Б). При этом масса мышей во время внутрижелудочного введения антибиотиков сначала снижалась, а после семи дней приема антибиотиков мыши восстанавливались (аналогично предыдущему эксперименту). На 8-й день эксперимента антибиотики были добавлены в питьевую воду. После смены метода предоставления антибиотиков мутантные мыши демонстрировали резкое снижение массы тела (Рисунок 3.16Б). При этом 50% мышей *Muc2^{-/-}* с

инфекциями, получавших антибиотики, на 13-й день эксперимента теряли до 35% массы тела относительно первоначальной массы (7 из 14 мышей) (Рисунок 3.16В). Интересно, что мутантные мыши с инфекциями, 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 (Fisher exact test $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно, по сравнению с группой «Muc2-/-инф+АБ», Рисунок 3.16В).

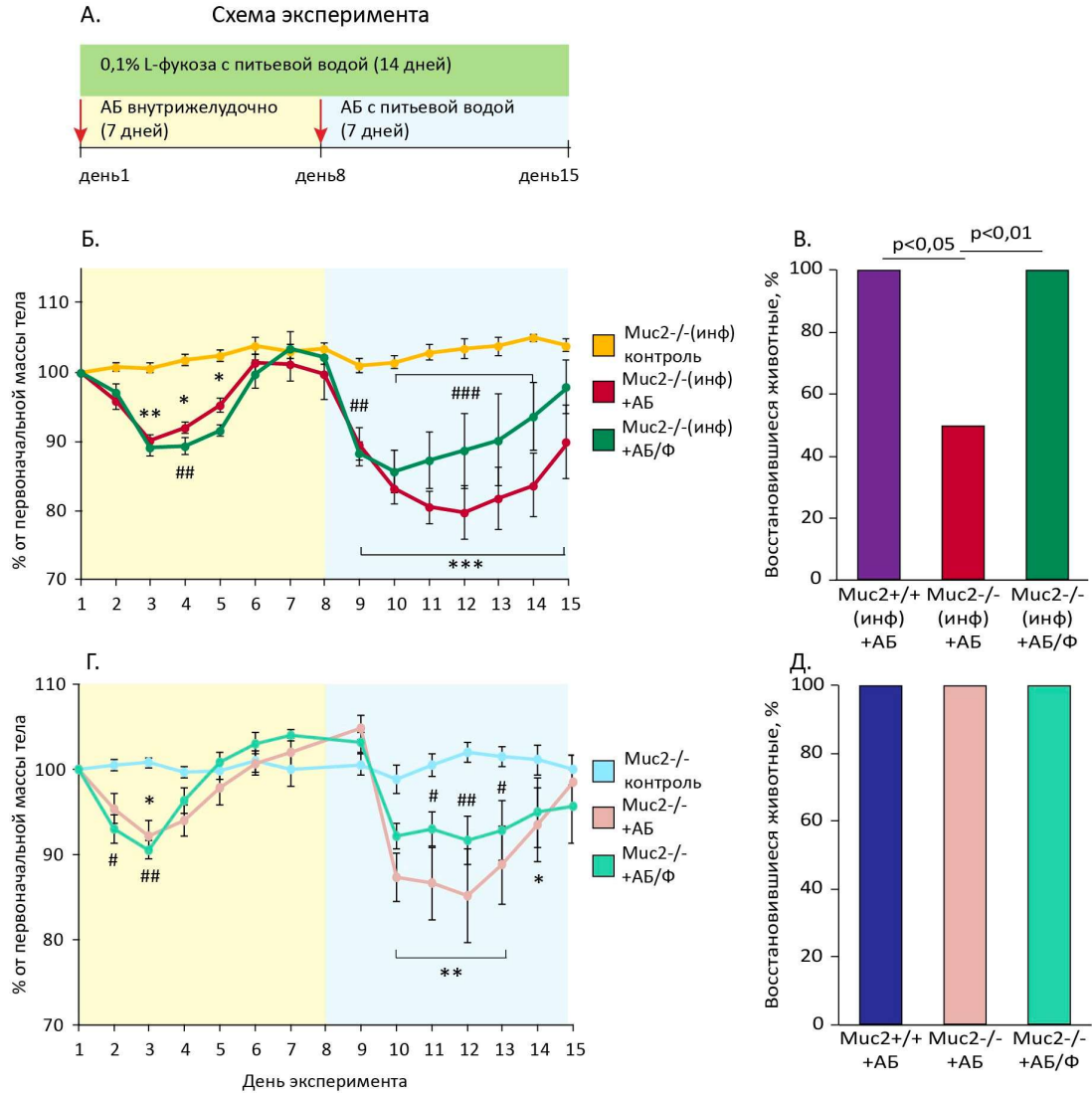


Рисунок 3.16 – Масса тела *Muc2^{-/-}* мышей после приема

антибиотиков и L-фукозы. А. Схема эксперимента. АБ – антибиотики.

Б. Процент от первоначальной массы тела *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями.

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

На массу мышей *Muc2^{-/-}*, свободных от инфекций, были обнаружены статистически значимые эффекты внутригруппового фактора, а также взаимодействие межгруппового и внутригруппового факторов (Repeated measures ANOVA $p < 0,001$; Рисунок 3.16Г). Мыши без инфекций также демонстрировали снижение массы тела во время приема антибиотиков, но полностью восстанавливались к концу эксперимента (13 из 13 мышей, Рисунок 3.16Д). Таким образом, обеднение бактериальной микрофлоры на фоне инфекций приводило к истощению мутантных мышей. Добавление к антибиотикам L-фукозы, как и отсутствие инфекций, отменяло наблюдаемый эффект.

3.6.2. Анализ микрофлоры кишечника мышей *Muc2^{-/-}* при приеме антибиотиков и L-фукозы

3.6.2.1. L-фукоза сдерживала разрастание *Tritrichomonas* sp. у мышей *Muc2^{-/-}* при приеме антибиотиков

Для того чтобы оценить эффект способа предоставления антибиотиков, количество *Tritrichomonas* sp. в фекалиях было определено на 8 день (после приема ежедневной разовой дозы антибиотиков внутривентрально в течение 7 дней), а также на 15 день (после 7 дней приема антибиотиков с питьевой водой). Было показано, что в обеих точках эксперимента на количество ДНК *Tritrichomonas* sp. оказывал эффект фактор экспериментальной группы (Kruskal-

Wallis test $H(2,19)=11,73$ $p < 0,01$ и $H(2,20)=8,26$ $p < 0,05$ соответственно). При этом высокая доза антибиотиков снижала количество *Tritrichomonas* sp. (Mann-Whitney U-test $Z=2,92$ и $Z=2,80$ $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, Рисунок 3.17А). Интересно, что смена способа предоставления антибиотиков способствовало разрастанию этого микроорганизма, а добавление L-фукозы отменяло данный эффект (Mann-Whitney U-test $Z=2,00$ и $Z=2,51$ $p < 0,05$ отличие группы «Muc2^{-/-}-инф+АБ/Ф» от остальных, Рисунок 3.17А).

Таким образом, истощение Muc2^{-/-} мышей с инфекциями было ассоциировано с разрастанием *Tritrichomonas* sp., которое сдерживалось добавлением к антибиотикам L-фукозы.

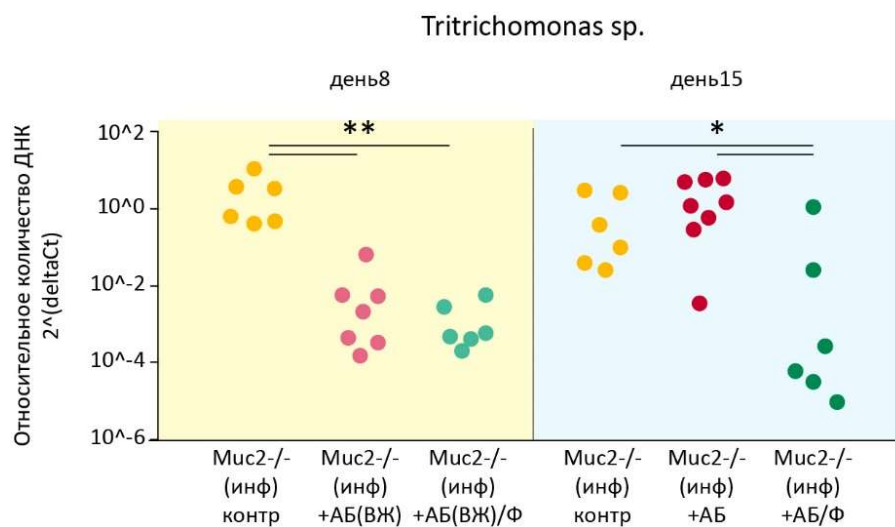


Рисунок 3.17 – Количество ДНК *Tritrichomonas* sp. (относительно ДНК 28S rRNA мыши) в фекалиях Muc2^{-/-} мышей после приема антибиотиков и L-фукозы *, ** - $p < 0,05$; $p < 0,01$; Mann-Whitney U-test

3.6.2.2. Прием антибиотиков оказывал разнонаправленное действие на бактериальную микрофлору Muc2^{-/-} мышей с инфекциями и без

Для того чтобы оценить изменения состава бактериальной микрофлоры у Muc2^{-/-} мышей с инфекциями и без инфекций был проведен метагеномный анализ методом секвенирования ампликонов гена 16S rRNA ($n=4$ для каждой группы).

Анализ показателей альфа-разнообразия не выявил различий между контрольными группами мышей Muc2^{-/-}. Прием антибиотиков приводил к уменьшению показателей альфа-разнообразия в группе мышей Muc2^{-/-} без инфекций «Muc2^{-/-}+АБ» по сравнению с остальными проанализированными

группами (Рисунок 3.18А). Однако при этом не наблюдалось изменения филогенетического разнообразия. То есть, снижение разнообразия бактерий у мышей без инфекций происходило за счет изменения представленности некоторых бактерий. Иными словами, под воздействием антибиотиков происходило перераспределение среди доминирующих в сообществе бактерий.

В фекалиях мышей с инфекциями, получавших антибиотики и антибиотики с L-фукозой, наоборот, не менялось альфа-разнообразие, но наблюдалось увеличение филогенетического разнообразия по сравнению с мышами контрольной группы, а также по сравнению с группой мышей без инфекций, получавшей антибиотики (Рисунок 3.18Б).

Анализ показателей бета-разнообразия не выявил различий между контрольными группами мышей. Антибиотики снижали бета-разнообразие у мышей без инфекций по сравнению с контрольной группой. У мышей с инфекциями предоставление антибиотиков и антибиотиков с L-фукозой, наоборот, приводило к увеличению бета-разнообразия по сравнению с контрольной группой. Более того, бета разнообразие отличалось в группах мышей с инфекциями, получавших антибиотики и L-фукозу, от получавших антибиотики мышей без инфекций (Рисунок 3.19). Полученные результаты говорят о том, что предоставление антибиотиков оказывало разнонаправленное действие на микрофлору мышей с инфекциями и без: у мышей без инфекций микрофлора становилась менее разнообразной, а у мышей с инфекциями, наоборот, более разнообразной.

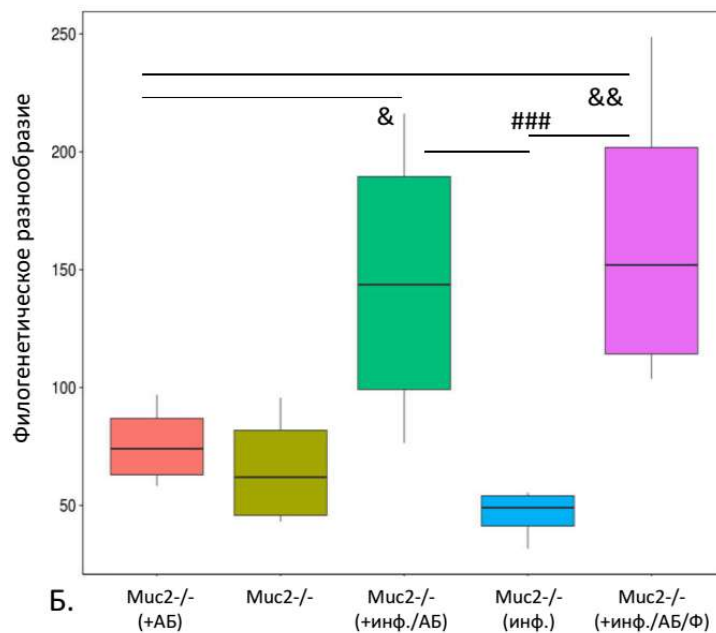
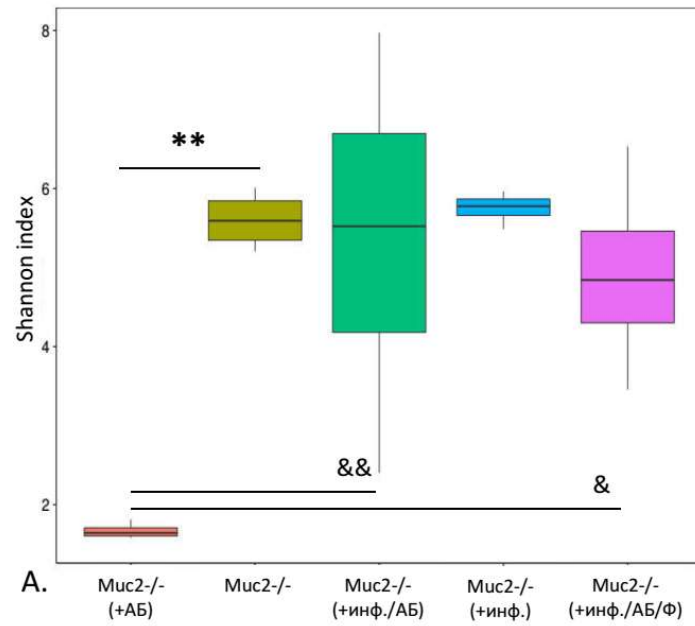


Рисунок 3.18 – Альфа-разнообразие и филогенетическое разнообразие бактериальной микрофлоры в фекалиях *Muc2*^{-/-} мышей. А. Результаты анализа альфа-разнообразия – Индекс Шеннона (Shannon index). ** - p < 0,01; &, && - p < 0,05; p < 0,01; Wilcoxon test
 Б. Результаты анализа филогенетического разнообразия. ### - p < 0,001; &, && - p < 0,05; p < 0,01; Wilcoxon test

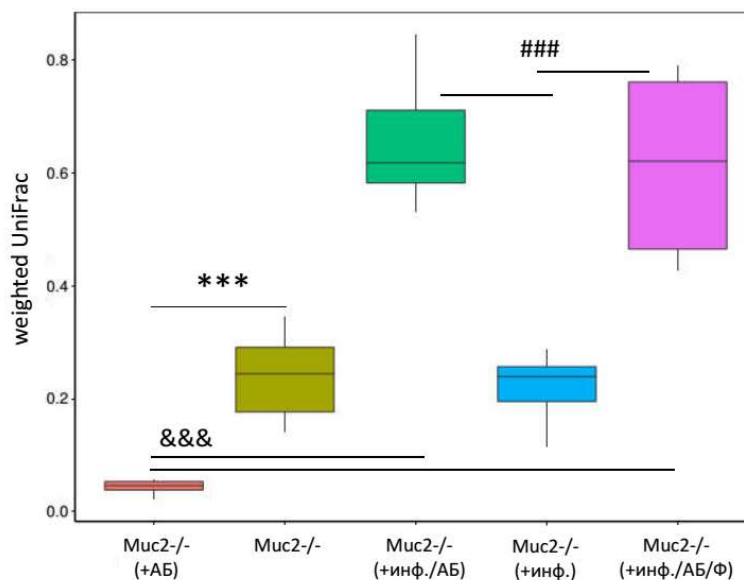


Рисунок 3.19 – Бета-разнообразие бактериальной микрофлоры в фекалиях *Muc2^{-/-}* мышей (weighted UniFrac). ***, &&&, ### - $p < 0,001$; Wilcoxon test

Анализ выявленных оперативных таксономических единиц (ОТЕ; OUT-Operational taxonomic unit) показал, за счет каких таксономических групп происходило изменение разнообразия микрофлоры. Микрофлора мышей из контрольных групп была в основном представлена типами *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia* (Рисунок 3.20). Предоставление антибиотиков приводило к статистически значимому преобладанию *Proteobacteria* и снижению остальных типов бактерий у мышей без инфекций (результаты статистической обработки представлены в Приложении №8). При этом на микрофлору мышей с инфекциями предоставление антибиотиков оказывало иной эффект. Перераспределение микрофлоры у них не было столь направленным, менялась относительная представленность различных минорных таксономических групп. Увеличивалась представленность типов *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, вероятно, за счет сокращения представленности типа *Bacteroidetes*. При этом микрофлора одного из проанализированных животных реагировала на воздействие антибиотиков, наоборот, увеличением представленности бактерий *Bacteroidetes*. Добавление к антибиотикам L-фукозы несколько меняло реакцию микрофлоры на антибиотики, доминантными оставались те же группы, что и у контрольных животных (Рисунок 3.20). Однако статистически значимых различий между этими группами

обнаружено не было. При этом было обнаружено, что после воздействия антибиотиков у мышей без инфекций детектировалось больше ОТЕ *Proteobacteria* и меньше ОТЕ *Firmicutes* и *Verrucomicrobia*, по сравнению с мышами, рожденными с инфекциями и получившими антибиотики, что подтверждает различия реакции микрофлоры *Muc2^{-/-}* мышей (данные представлены в Приложении №8).

Таким образом, воздействие антибиотиков приводило к изменению бактериального состава микрофлоры *Muc2^{-/-}* мышей, рожденных с инфекциями и без. Однако, эффект антибиотиков был разнонаправленным. Добавление L-фукозы не оказывало значимых эффектов на бактериальную микрофлору мышей на фоне приема антибиотиков.

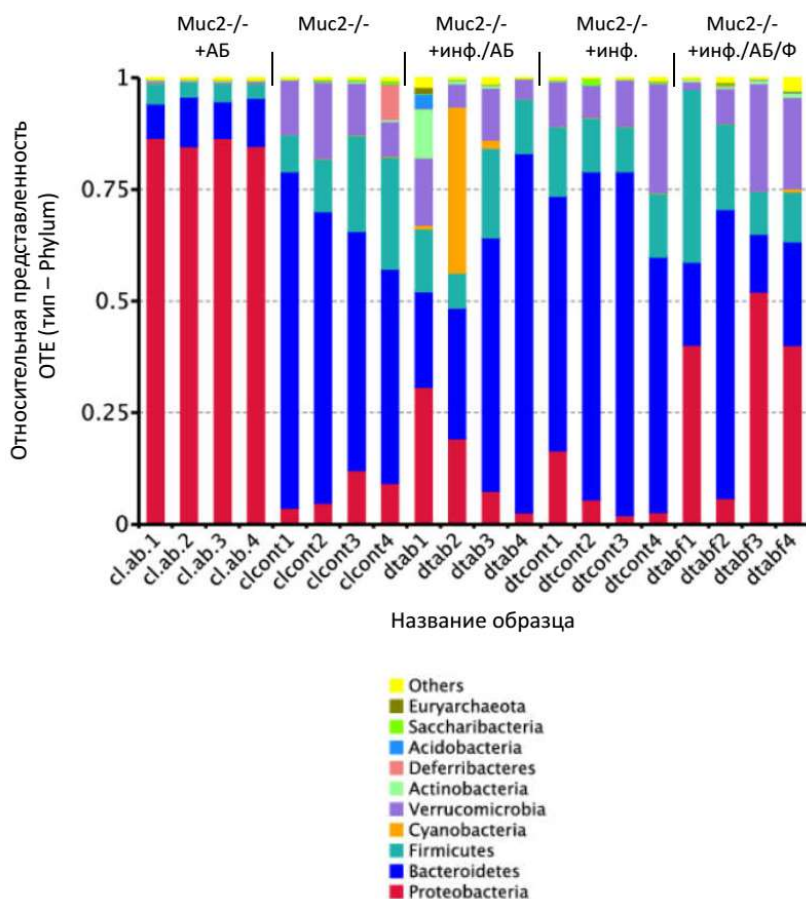


Рисунок 3.20 – Относительная представленность ОТЕ (Phylum).

3.6.3. Прием антибиотиков и L-фукозы влиял на количество внутриклеточных ферментов в крови *Muc2^{-/-}* мышей

Для того чтобы оценить цитотоксическое действие антибиотиков и нарушения микрофлоры, у мышей было исследовано количество внутриклеточных ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ), а также количество лактата в крови. Был обнаружен эффект группы на концентрацию АЛТ в крови мутантных мышей, как с инфекциями, так и без них (Kruskal-Wallis test $H(2,20)=14,41$ $p < 0,001$ и $H(2,19)=11,20$ $p < 0,01$ соответственно). Прием антибиотиков и антибиотиков с L-фукозой способствовал повышению концентрации данного фермента в крови у *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями (Mann-Whitney U-test $Z=3,03$ $p < 0,01$; по сравнению с контрольной группой, Рисунок 3.21А) и без инфекции (Mann-Whitney U-test $Z=2,84$ и $Z=2,41$ $p < 0,05$; Рисунок 3.21В). Эффект группы на количество АСТ наблюдался только у мутантных мышей с инфекцией (Kruskal-Wallis test $H(2,20)=8,86$ $p < 0,05$). Прием антибиотиков также приводил к повышению концентрации АСТ в крови мышей (Mann-Whitney U-test $Z=2,64$ $p < 0,01$; Рисунок 3.21А). Однако добавление к антибиотикам L-фукозы отменяло повышение АСТ (Mann-Whitney U-test $Z=2,16$ $p < 0,05$; по сравнению с группой «*Muc2^{-/-}-инф+АБ*», Рисунок 3.21А). При этом у мышей дикого типа прием антибиотиков не оказывал эффект на количество исследованных ферментов (данные представлены в Приложении №9). Таким образом, увеличение концентрации внутриклеточных ферментов в крови, которое может свидетельствовать об обширной гибели клеток, наблюдалось у мутантных мышей на фоне приема антибиотиков, при этом мыши с инфекциями были более чувствительны к такому воздействию. На количество лактата, который считается одним из маркеров сепсиса (Faix, 2013), в крови прием антибиотиков не оказывал эффект ни в одной группе (Рисунок 3.21Б, Г).

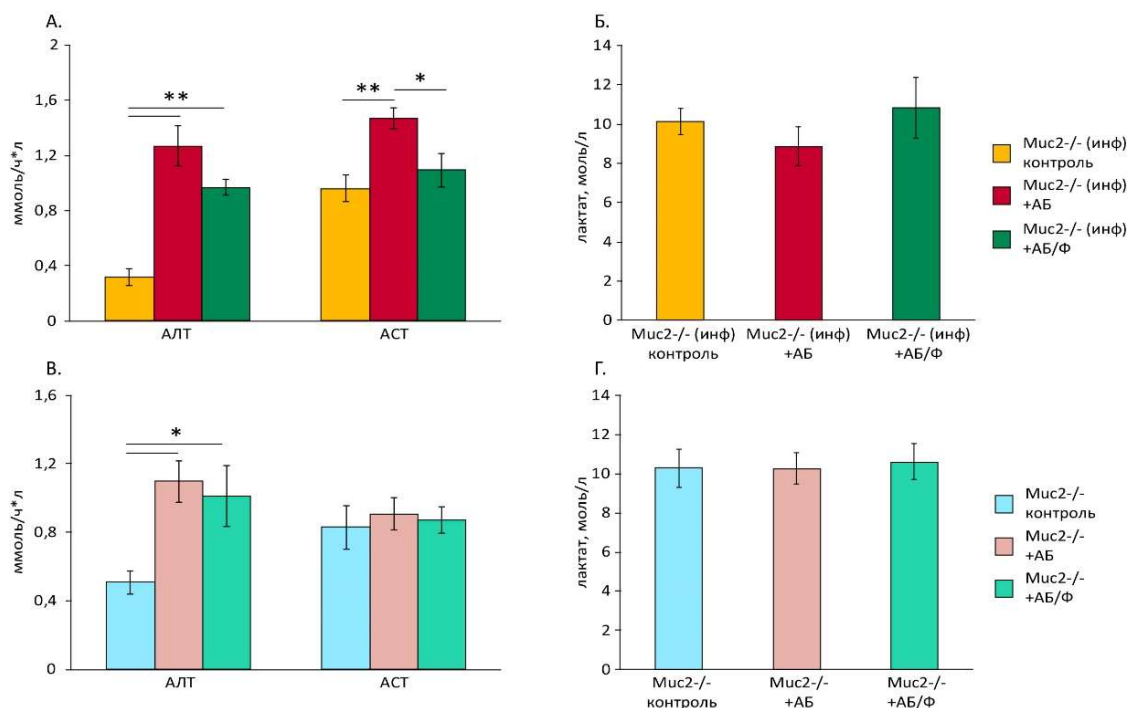


Рисунок 3.21 – Количество внутриклеточных ферментов и лактата в крови у мышей *Muc2*^{-/-} после воздействия антибиотиков и L-фукозы. А. Количество АЛТ и АСТ у мышей с инфекциями. Б. Количество лактата у мышей с инфекциями. В. Количество АЛТ и АСТ у мышей без инфекций. Г. Количество лактата у мышей без инфекций. *, ** - $p < 0,05$; $p < 0,01$; Mann-Whitney U-test. Количество мышей в группе для АЛТ и АСТ: $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}) = 8$; $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}) = 6$; $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}/\text{Ф}) = 6$; $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 8$; $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}) = 6$; $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-АБ}/\text{Ф}) = 5$; для лактата: $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}) = 7$; $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}) = 8$; $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}/\text{Ф}) = 5$; $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 6$; $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}) = 7$; $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-АБ}/\text{Ф}) = 7$.

3.6.4. Прием антибиотиков приводил к повышению IL-1 β в ткани толстой кишки *Muc2*^{-/-} мышей, а L-фукоза нивелировала этот эффект у мышей с инфекциями

Нарушение микрофлоры может приводить к провоспалительным реакциям, поэтому мы оценили эффект антибиотиков и L-фукозы на количество провоспалительного цитокина IL-1 β в ткани толстой кишки. Воздействия на микрофлору действительно оказывали эффект на количество IL-1 β (эффект группы Kruskal Wallis test $H(5,38)=22,44$ $p < 0,001$). Прием антибиотиков вызывал увеличение количества этого цитокина в ткани толстой кишки мышей *Muc2*^{-/-} независимо от присутствия инфекций (Mann-Whitney U-test $Z=3,03$ и $Z=2,64$ $p < 0,01$; по сравнению с контрольной группой соответствующего

микробиологического статуса, Рисунок 3.22). Добавление к антибиотикам L-фукозы нивелировало увеличение данного цитокина только у мышей, рожденных с инфекциями (Mann-Whitney U-test $Z=2,16$ $p < 0,05$; по сравнению с «Muc2^{-/-}-инф+АБ», Рисунок 3.22). При этом уровень IL-1 β был выше в контрольной группе мышей, рожденных с инфекциями, по сравнению со свободными от инфекций (Mann-Whitney U-test $Z=3,18$ $p < 0,01$, Рисунок 3.22).

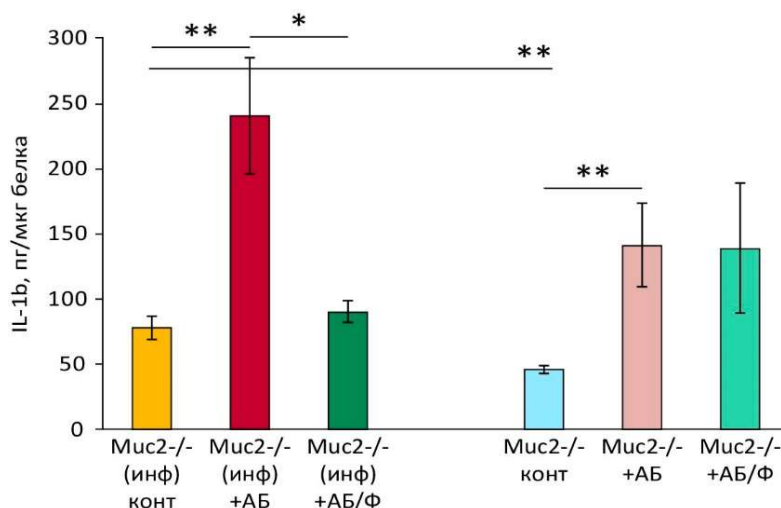


Рисунок 3.22 – Количество IL-1 β в ткани толстой кишки у мышей Muc2^{-/-} после воздействия антибиотиков и L-фукозы. *, ** - $p < 0,05$; $p < 0,01$; Mann-Whitney U-test
 Количество мышей в группе: n(Muc2^{-/-}-инф)=7; n(Muc2^{-/-}-инф+АБ)=6; n(Muc2^{-/-}-инф+АБ/Ф)=6; n(Muc2^{-/-})=7; n(Muc2^{-/-}+АБ)=6; n(Muc2^{-/-}-АБ/Ф)=5.

3.6.5. Прием антибиотиков приводил к снижению клеточности и регуляторных Т-клеток в мезентериальных ЛУ Muc2^{-/-} мышей

Повышение количества IL-1 β в кишечнике после приема антибиотиков может говорить о развитии провоспалительных иммунных реакций. Ранее при исследовании особенностей иммунной системы Muc2^{-/-} мышей мы обнаружили увеличение процента регуляторных Т-клеток в мезентериальных ЛУ у мышей с инфекциями по сравнению с мышами без инфекций. Можно предположить, что регуляторные Т-клетки играют важную роль при наличии инфекций у мышей с нарушенной барьерной функцией. В данном эксперименте мы исследовали лимфоциты мезентериальных ЛУ после обеднения бактериальной микрофлоры.

Было показано, что воздействия на микрофлору оказывали эффект на процент CD25⁺Foxp3⁺ клеток среди CD4⁺ в мезентериальных ЛУ у Muc2^{-/-} мышей с

инфекциями и без (эффект группы Kruskal-Wallis test $H(2,20)=6,24$ и $H(2,19)=8,25$ $p < 0,05$ соответственно). Воздействие антибиотиками и L-фукозой приводило к статистически значимому снижению процентного состава данной субпопуляции у *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями и без них (Mann-Whitney U-test $Z=2,43$ $p < 0,05$ и $Z=2,64$ $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, Рисунки 3.23А и 3.23Б). В группе мышей с инфекциями, получавшей только антибиотики, наблюдалась аналогичная тенденция (Mann-Whitney U-test $Z=1,79$ $p = 0,072$; Рисунок 3.23А). Такие изменения, по-видимому, происходили за счет снижения экспрессии белка Foxp3 (эффект группы Kruskal-Wallis test $H(2,20)=7,95$ и $H(2,19)=8,25$ $p < 0,05$). Антибиотики в сочетании с L-фукозой снижали процент Foxp3⁺ клеток среди CD4⁺ у мышей с инфекциями и без них (Mann-Whitney U-test $Z=2,76$ и $Z=2,80$ $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, Рисунки 3.23А и 3.23Б). Воздействие только антибиотиками также вызывало близкое к статистически значимому снижение этого показателя (Mann-Whitney U-test $Z=1,90$ $p = 0,056$ и $Z=1,92$ $p = 0,053$; Рисунок 3.23 А,Б). Таким образом, обеднение микрофлоры вызывало снижение процента Foxp3⁺ клеток.

Анализ количества клеток в мезентериальных ЛУ выявил эффект группы на клеточность ЛУ, как у мышей с инфекциями, так и без них (Kruskal-Wallis test $H(2,20)=10,42$ и $H(2,19)=11,23$ $p < 0,01$). Аналогичный эффект был выявлен и на количество регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Kruskal-Wallis test $H(2,20)=12,70$ и $H(2,19)=11,73$ $p < 0,01$). Антибиотики снижали клеточность и количество регуляторных Т-клеток у мышей с инфекциями (Mann-Whitney U-test $Z=2,85$ и $Z=3,18$ $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, Рисунок 3.23 Д) и без инфекций (Mann-Whitney U-test $Z=2,78$ и $Z=2,92$ $p < 0,01$; Рисунок 3.23 Е). При этом добавление L-фукозы отменяло снижение клеточности и регуляторных Т-клеток у *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями (Mann-Whitney U-test $Z=1,97$ $p < 0,05$ по сравнению с группой «*Muc2^{-/-}-инф+АБ*», Рисунок 3.23 В,Д). Таким образом, добавление L-фукозы корригировало эффект антибиотиков на снижение количества регуляторных Т-клеток и клеточности ЛУ, но не влияло на субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток.

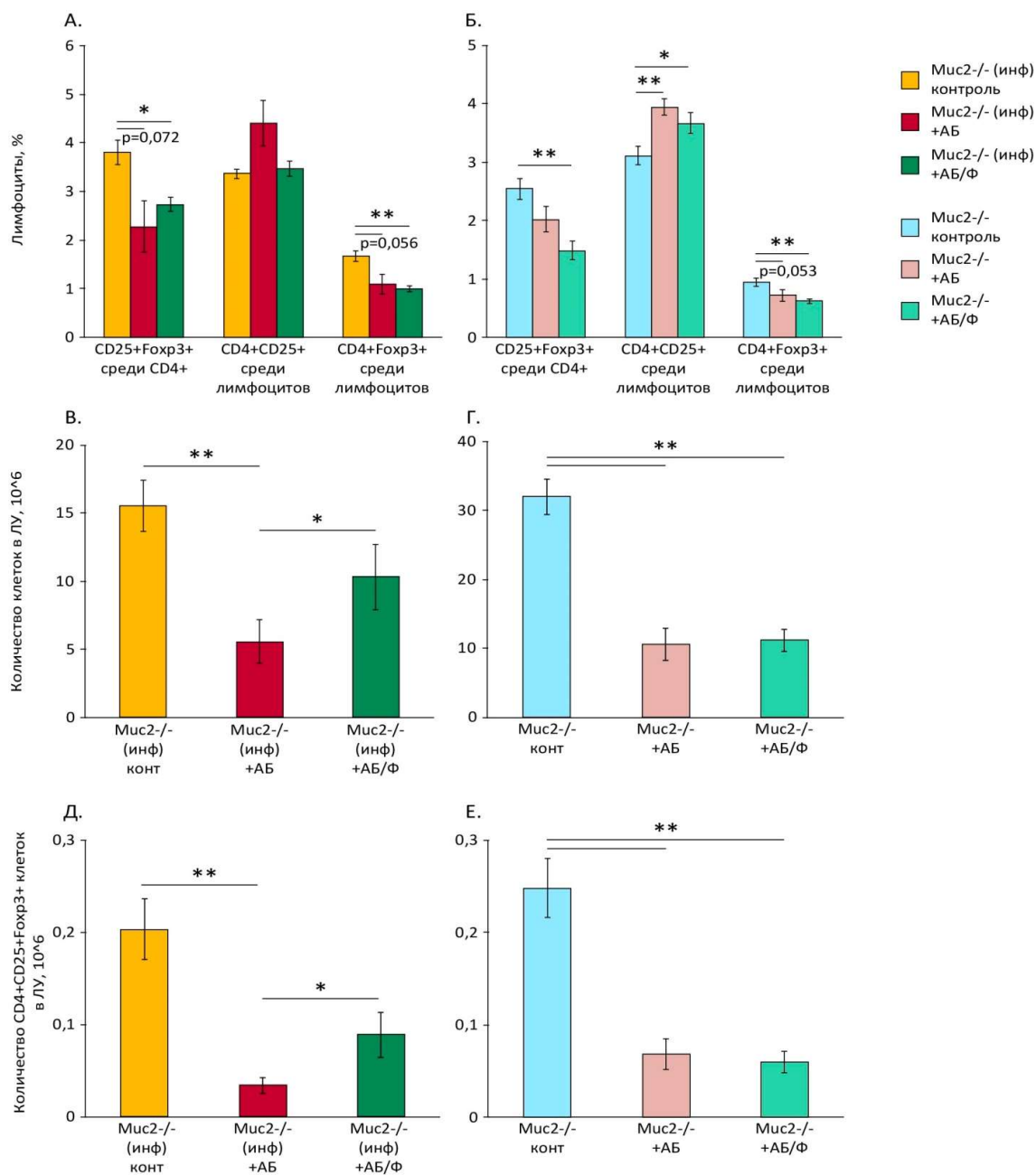


Рисунок 3.23 – Регуляторные Т-клетки мезентериальных ЛУ мышей *Muc2^{-/-}* после воздействия антибиотиков и L-фукозы. А. Процентный состав субпопуляций лимфоцитов у мышей с инфекциями. Б. Процентный состав субпопуляций лимфоцитов у мышей свободных от инфекций. В. Количество клеток в ЛУ у мышей с инфекциями. 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. *, ** - $p < 0,05$; $p < 0,01$; Mann-Whitney U-test.

Количество мышей в группе: $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}) = 7$; $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}) = 8$; $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ}/\Phi) = 5$; $n(\text{Muc2}^{-/-}) = 6$; $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}) = 7$; $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ}/\Phi) = 6$.

3.7. Влияние обеднения микрофлоры на иммунный статус мышей *Muc2^{-/-}* с инфекциями и без

Антибиотики оказывали негативный эффект на клеточность мезентериальных ЛУ, а также вызывали увеличение провоспалительного цитокина IL-1 β в кишечнике, что может свидетельствовать об активации провоспалительных реакций иммунной системы. Известно, что обеднение микрофлоры антибиотиками вызывает лейкопению, что может быть обусловлено снижением дифференцировки лейкоцитов в красном костном мозге вследствие недостатка сигналов от кишечной микрофлоры (Josefsdottir et al., 2017). В условиях нарушенной барьерной функции и присутствия инфекции такие нарушения могут быть критичными для организма. В связи с этим, мы более подробно исследовали влияние антибиотиков иммунную систему мутантных мышей.

3.7.1. Обеднение микрофлоры приводило к количественному снижению субпопуляций и перераспределению CD4/CD8 лимфоцитов в крови

Анализ клеток крови показал, что прием антибиотиков оказывал эффект на общую концентрацию лимфоцитов, а также отдельных субпопуляций CD19⁺, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ (Kruskal-Wallis test $H(1,25)=16,20$; $H(1,25)=13,68$; $H(1,25)=17,54$; $H(1,25)=14,91$ соответственно, $p < 0,001$). Антибиотики снижали общее количество лимфоцитов, а также CD3⁺ и CD3⁺CD4⁺ у *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями (Mann-Whitney U-test $Z=3,06$; $p < 0,01$ по сравнению с контролем) и без инфекций (Mann-Whitney U-test $Z=2,28$ $p < 0,05$; $Z=2,64$ $p < 0,01$; $Z=2,46$ $p < 0,05$ по сравнению с контролем, Рисунок 3.24А). Снижение количества CD19⁺ лимфоцитов было статистически значимым только у мышей с инфекциями (Mann-Whitney U-test $Z=3,06$ $p < 0,01$; Рисунок 3.24А). При этом, несмотря на вызванное антибиотиками снижение общего количества лимфоцитов почти в 2 раза, количество CD4⁺CD8⁺ клеток не менялось. Анализ процентного состава субпопуляций лимфоцитов в крови выявил влияние антибиотиков на процент CD4⁺ и CD8⁺ клеток среди CD3⁺ (Kruskal-Wallis test $H(1,25)=6,53$ $p < 0,01$ и $H(1,25)=11,37$ $p < 0,001$ соответственно). У *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями антибиотики вызывали снижение процента CD4⁺ и увеличение CD8⁺ клеток (Mann-Whitney U-test $Z=2,55$ $p < 0,05$ и $Z=2,81$ $p < 0,01$ по сравнению с контролем; Рисунок 3.24Б). Таким образом, обеднение

микрофлоры приводило к снижению количества лимфоцитов в крови, при этом у мышей с инфекциями происходило перераспределение в сторону $CD3^+CD8^+$ клеток. Эффекты антибиотиков на лимфоциты в крови мышей $Muc2^{+/+}$ имели аналогичные тенденции (данные представлены в Приложении №10).

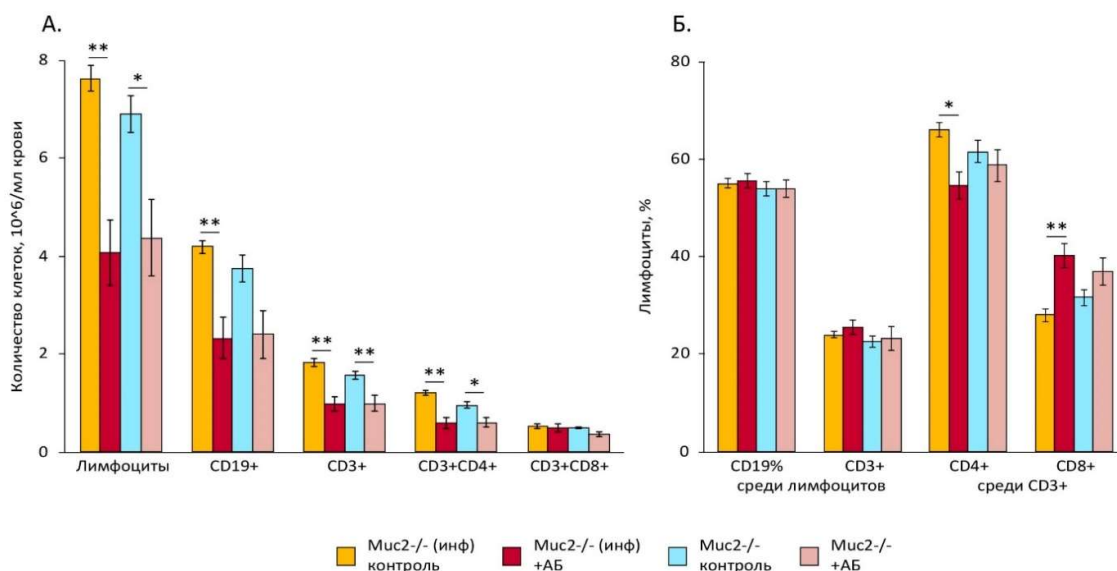


Рисунок 3.24 – Лимфоциты в крови у $Muc2^{-/-}$ мышей после воздействия антибиотиков. А. Количество лимфоцитов в крови у мышей. Б. Процентное содержание лимфоцитов в крови у мышей. Количество мышей в группе: $n(Muc2^{-/-}\text{-инф})=7$; $n(Muc2^{-/-}\text{-инф+АБ})=7$; $n(Muc2^{-/-})=5$; $n(Muc2^{-/-}\text{+АБ})=6$. *, ** - $p < 0,05$; $p < 0,01$; Mann-Whitney U-test

3.7.2. Обеднение микрофлоры приводило к снижению клеточности тимуса

Анализ тимуса выявил влияние антибиотиков на общее количество тимоцитов (Kruskal-Wallis test $H(1,25)=14,91$ $p < 0,001$). Прием антибиотиков вызывал уменьшение клеточности (условного количества клеток) тимуса у мышей с инфекциями и без них (Mann-Whitney U-test $Z=2,92$ $p < 0,01$ и $Z=2,11$ $p < 0,05$ по сравнению с контролем, Рисунок 3.25А). Аналогичный эффект был обнаружен и для отдельных субпопуляций тимоцитов на разных стадиях созревания: $CD4^+CD8^-$, $CD8^+CD4^+$, дубль-позитивных $CD4^+CD8^+$ и дубль-негативных (DN) $CD4^-CD8^+$ клеток (Kruskal-Wallis test $H(1,25)=15,33$; $H(1,25)=11,37$; $H(1,25)=15,33$; $H(1,25)=11,74$ соответственно, $p < 0,001$). У мышей наблюдалось статистически значимое снижение количества $CD4^+CD8^-$ (Mann-Whitney U-test $Z=2,64$ и $Z=2,59$ $p < 0,01$; Рисунок 3.25А) и $CD4^+CD8^+$ (Mann-Whitney U-test $Z=2,92$ $p < 0,01$ и $Z=2,11$ $p < 0,05$; Рисунок 3.25А). Статистически значимым снижением $CD4^-CD8^+$ и DN

клеток было только у мышей, свободных от инфекций (Mann-Whitney U-test $Z=2,76$ и $Z=2,59$ $p < 0,01$; Рисунок 3.25А). У мышей с инфекциями снижение DN клеток было близко к статистически значимому (Mann-Whitney U-test $Z=1,92$ $p = 0,053$; Рисунок 3.25А). Также были исследованы стадии созревания тимоцитов внутри субпопуляции DN: DN1 ($CD44^+CD25^-$), DN2 ($CD44^+CD25^+$), DN3 ($CD44^-CD25^+$), DN4 ($CD44^-CD25^-$). Прием антибиотиков оказывал статистически значимый эффект на количество клеток на стадиях DN1 и DN4 (Kruskal-Wallis test $H(1,25)=5,72$ $p < 0,05$ и $H(1,25)=12,50$ $p < 0,001$ соответственно). Снижение количества DN1 клеток было статистически значимым только у мышей с инфекциями (Mann-Whitney U-test $Z=2,07$ $p < 0,05$; Рисунок 3.25Б). Количество клеток субпопуляции DN4 снижалось у мышей без инфекций, а у мышей с инфекциями наблюдалась аналогичная тенденция (Mann-Whitney U-test $Z=2,76$ $p < 0,01$ и $Z=1,78$ $p = 0,074$; Рисунок 3.25Б).

Таким образом, обеднение микрофлоры оказывало негативный эффект на клеточность тимуса мышей, независимо от присутствия инфекций. При этом стоит отметить, что присутствие инфекций не влияло на исследуемые показатели у интактных мышей. Влияние антибиотиков на тимус мышей дикого типа имело аналогичные тенденции (данные представлены в Приложении №11).

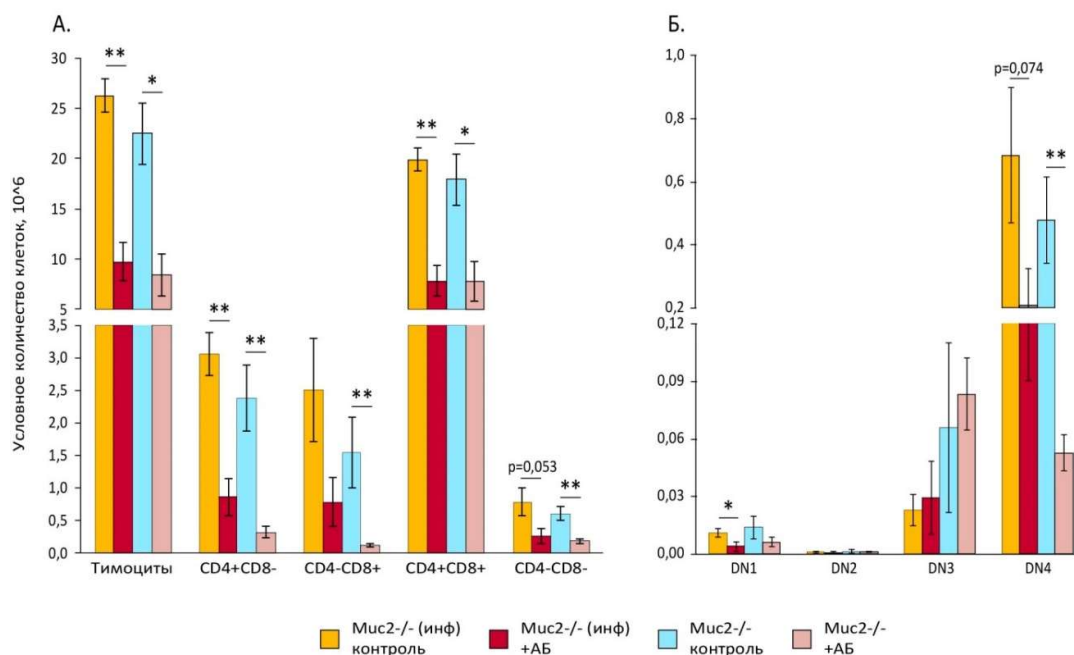


Рисунок 3.25 – Влияние антибиотиков на количество тимоцитов у *Muc2^{-/-}* мышей. А. Условное количество клеток тимуса. Б. Условное количество тимоцитов на стадиях DN1, DN2, DN3 и DN4. Количество мышей в группе: $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф})=7$; $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф+АБ})=6$; $n(\text{Muc2}^{-/-})=5$; $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-+АБ})=7$.

*, ** - $p < 0,05$; $p < 0,01$; Mann-Whitney U-test

3.7.3. Обеднение микрофлоры приводило к снижению клеточности селезенки и увеличению процентного содержания CD3^+ и $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ спленоцитов

Анализ селезенки выявил эффект приема антибиотиков на клеточность (условное количество клеток) (Kruskal-Wallis test $H(1,30)=10,51$ $p < 0,01$). Количество клеток селезенки снижалось у *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями и без (Mann-Whitney U-test $Z=2,11$ $p < 0,05$ и $Z=2,55$ $p < 0,01$ соответственно, по сравнению с контролем, Рисунок 3.26А). При этом на количество отдельных субпопуляций спленоцитов такой эффект не был обнаружен (Рисунок 3.26А). Антибиотики также влияли на процентное содержание некоторых субпопуляций спленоцитов. Был обнаружен эффект приема антибиотиков на процент CD3^+ (Т-клеток), а также процент CD8^+ клеток среди CD3^+ (Kruskal-Wallis test $H(1,24)=11,13$ и $H(1,24)=14,48$ $p < 0,001$). Антибиотики вызывали статистически значимое увеличение процента Т-клеток у мышей с инфекциями и близкое к достоверному повышению этого показателя у мышей без инфекций (Mann-Whitney U-test $Z=2,59$ $p < 0,01$ и $Z=1,94$ $p = 0,051$ соответственно, Рисунок 3.26Б). При этом среди Т-клеток увеличивался процент CD8^+ клеток (Mann-Whitney U-test $Z=2,76$ и $Z=2,59$ $p < 0,01$; Рисунок 3.26Б).

Таким образом, обеднение микрофлоры снижало клеточность селезенки мышей, независимо от присутствия инфекций. Помимо этого, угнетение бактерий способствовало увеличению процента Т-клеток в селезенке, за счет увеличения $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$. Аналогичный эффект антибиотиков на $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ клетки наблюдался и в крови. У интактных мышей присутствие инфекций не влияло на данные показатели. На селезенку *Muc2^{+/+}* мышей антибиотики не оказывали таких сильных эффектов (Приложение №12).

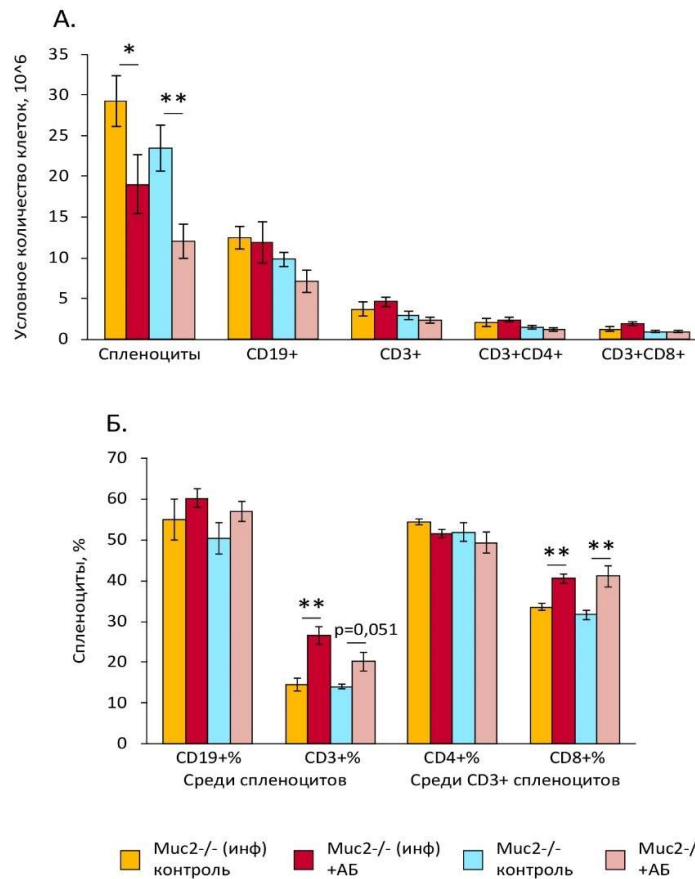


Рисунок 3.26 – Влияние антибиотиков на спленоциты у *Muc2^{-/-}* мышей. А. Условное количество спленоцитов. Б. Процентное содержание субпопуляций спленоцитов. Количество животных в группе для «спленоциты» на рисунке А: $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф})=9$; $n(\text{Muc2}^{-/-}\text{-инф}+\text{АБ})=7$; $n(\text{Muc2}^{-/-})=7$; $n(\text{Muc2}^{-/-}+\text{АБ})=7$. 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.

Глава 4. Обсуждение результатов

В данной работе при помощи модели ВЗК – мышей с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2^{-/-}*) была исследована роль муцина2 и его структурного компонента L-фукозы в регуляции барьерной функции кишечника.

4.1. Влияние дефицита муцина2 на иммунный статус мышей

На первом этапе исследования был проведен сравнительный анализ мышей с нарушенной барьерной функцией в кишечнике (*Muc2^{-/-}* на генетическом фоне C57BL/6) и мышей контрольной линии C57BL/6. В данном эксперименте были использованы мыши *Muc2^{-/-}*, у которых детектировался инфекционный агент *Helicobacter* spp. Известно, что бактерии *Helicobacter* spp. могут стимулировать и осложнять воспаление в кишечнике у мышей, особенно в условиях недостаточности функции иммунной системы (Burich et al., 2001; Cahill et al., 1997; Foltz et al., 1998; Kullberg et al., 1998; Monceaux et al., 2013). Помимо этого, есть данные о том, что бактерии рода *Helicobacter* могут быть ассоциированы с ВЗК у людей (Kaakoush et al., 2010; Man et al., 2008; Thomson et al., 2011; Zhang et al., 2006). С другой стороны, в некоторых исследованиях у пациентов с ВЗК бактерии *Helicobacter* spp. не были выявлены (Bell et al., 2003; Huijsdens et al., 2004). Поскольку ВЗК представляют собой многофакторные заболевания со сложной и не до конца известной этиологией, сделать однозначный вывод о вовлеченности в патогенез того или иного микроорганизма не представляется возможным. Однако данные о том, что бактерии *Helicobacter* spp. могут стимулировать воспаление в кишечнике, позволяют использовать их в качестве инфекционного агента в экспериментальных моделях ВЗК. Таким образом, в данной работе была использована модель ВЗК, сочетающая в себе генетически обусловленное нарушение барьера с присутствием инфекционных агентов в кишечнике. В связи с этим было необходимо оценить характеристики иммунной системы мышей *Muc2^{-/-}* на фоне инфекции.

В кишечнике с нормальной барьерной функцией мукусный слой, состоящий главным образом из гликопротеина муцина2, препятствует прямому контакту бактерий с эпителием. В кишечнике мышей *Muc2^{-/-}*, вследствие отсутствия этого гликопротеина, бактерии могут вступать в прямой контакт с эпителиальными

клетками (Johansson et al., 2008). Также есть данные о том, что у *Muc2*^{-/-} мышей повышена проницаемость кишечника по сравнению с мышами дикого типа (Kumar et al., 2017). Аналогичные данные были получены и в нашей лаборатории, было показано, что у мышей *Muc2*^{-/-} повышена проницаемость кишечника по сравнению с C57BL/6 (Borisova, Achasova, et al., 2020). Таким образом, у *Muc2*^{-/-} мышей бактерии и их компоненты могут в большей степени взаимодействовать с эпителиальными клетками кишечника и иммунной системой, чем у мышей с нормальным мукусным барьером.

Анализ срезов ткани восходящего отдела толстой кишки не выявил признаков острого воспаления (отек, эрозия эпителия, лейкоцитарные инфильтраты) у мышей *Muc2*^{-/-}, однако была обнаружена гиперплазия крипт, а также большее количество лейкоцитов в ткани кишки по сравнению с мышами C57BL/6. То есть, у мутантных мышей, даже в присутствии инфекционного агента *Helicobacter* spp., в кишечнике не было обнаружено острого воспаления, но наблюдались признаки хронического воспаления. Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов о том, что на генетическом фоне C57BL/6 у мышей с мутацией в гене *Muc2* обострение колита наблюдается в более позднем возрасте (в возрасте 8-20 недель симптомы колита наблюдаются редко) (Wenzel et al., 2014), чем на генетическом фоне 129SV (Van der Sluis et al., 2006).

Исследование экспрессии генов, вовлеченных в воспалительные реакции, показало повышение экспрессии генов 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* (регуляторные Т-клетки), при этом экспрессия транскрипционного фактора *Tbx21*, характерного для Th1, не повышалась. Такие результаты могут говорить о том, что в кишечнике *Muc2*^{-/-} мышей вследствие тесного контакта иммунной системы с микрофлорой могут быть активированы различные иммунные механизмы, способствующие толерантности иммунной системы и поддержанию хронического воспаления в неактивной фазе.

Поскольку гистологический анализ ткани толстой кишки выявил гиперплазию крипт без явных признаков нарушения целостности эпителия, мы исследовали экспрессию факторов, участвующих в восстановлении ткани после

повреждений. Оказалось, что у мутантных мышей была повышена экспрессия *Tff3*. Этот фактор вырабатывается бокаловидными клетками, входит в состав мукусового барьера и способствует восстановлению эпителия (Kim and Ho, 2010). Помимо этого, была исследована экспрессия генов ферментов макрофагов *Nos2* и *Arg1*. Данные ферменты используются в качестве маркеров функциональной активации макрофагов. Экспрессия фермента NOS2 характерна для макрофагов 1-го типа (M1), которые обладают провоспалительными свойствами. Продукция ARG1 свойственна макрофагам 2-го типа (M2), которые характеризуются противовоспалительными свойствами, стимулируют восстановление поврежденных тканей, а также играют роль в процессах образования опухолей (Sharoufi-Moghaddam et al., 2018). В настоящей работе мы впервые показали, что у мышей в условиях отсутствия муцина2 повышена экспрессия гена *Arg1*, что может указывать на поляризацию макрофагов по типу M2. Такой эффект у мышей с мутацией может быть связан с необходимостью ускоренного восстановления ткани, которая повреждается вследствие тесного контакта с бактериями, а также это может быть причиной гиперплазии крипт в толстой кишке. Поскольку макрофаги M2 типа могут играть важную роль в процессе опухолеобразования, можно предположить, что наблюдаемое у *Muc2^{-/-}* формирование опухолей (Bao et al., 2014; Velcich et al., 2002) может быть следствием активации M2 макрофагов и хронического воспаления в кишечнике.

Помимо этого, у *Muc2^{-/-}* мышей было обнаружено повышение экспрессии гена *Ptgs2*. Фермент циклооксигеназа2 нарабатывается макрофагами и участвует в синтезе медиаторов воспаления, что стимулирует провоспалительные реакции иммунной системы. Также есть данные о том, что данный фермент играет роль в опухолеобразовании в различных генетических моделях, в том числе и у мышей *Muc2^{-/-}* (Yang et al., 2008). В данной статье авторы демонстрировали роль отсутствия муцина2 в опухолеобразовании в кишечнике, а также рассуждали о том, что одной из причин образования опухолей является хроническое воспаление низкой интенсивности (low-grade inflammation) у *Muc2^{-/-}* мышей. Таким образом, полученные данные об изменении экспрессии генов, указывают на особенности иммунной функции в условиях нарушенного барьера в кишечнике.

В условиях повышенной проницаемости кишечника у мутантных животных в присутствии инфекции был также активирован специфический иммунитет. Было обнаружено увеличение количества IgG в толстой кишке, а также повышение в крови концентрации IgG против собственной кишечной микрофлоры у *Muc2*^{-/-} мышей по сравнению с C57BL/6. При этом количество IgA в толстой кишке не отличалось у мышей двух генотипов. Данные исследований с участием пациентов с ВЗК демонстрировали увеличение процента связанных с IgG бактерий в фекалиях у больных в острой фазе заболевания и с недавней ремиссией (Harmsen et al., 2012; van der Waaij et al., 2004). Есть данные об увеличении не только связанных с IgG бактерий, но и о повышении свободных IgG и IgA в фекалиях у пациентов с ВЗК. При этом количество иммуноглобулинов коррелировало с активностью заболевания (Lin et al., 2018). Поскольку мы проводили определение количества IgG в содержимом толстой кишки методом ИФА, можно говорить лишь об увеличении общего количества иммуноглобулина (связанного или несвязанного с бактериями). Однако полученные результаты показывают, что нарушение барьерной функции в кишечнике, может сопровождаться активацией гуморального иммунитета.

Итак, в настоящем исследовании мыши *Muc2*^{-/-} выступают в качестве модели хронического воспаления в кишечнике. На примере данной модели можно наблюдать некоторые адаптационные механизмы, которые могут иметь место при генетически обусловленном нарушении барьерной функции в кишечнике.

Отсутствие муцина2 может влиять не только на иммунную систему, но и на микрофлору в кишечнике. Известно, что кишечные бактерии способны расщеплять олигосахариды, входящие в состав муцина2, и использовать полученные моносахариды в качестве источника энергии (Tailford et al., 2015). Одним из моносахаридов, входящих в состав муцина2, является фукоза. Этот моносахарид играет важную роль в колонизации кишечника бактериями и взаимодействии микрофлоры с организмом хозяина (Pickard and Chervonsky, 2015; Tailford et al., 2015). В данном исследовании мы показали, что у *Muc2*^{-/-} мышей в кишечнике меньше связанной с белком фукозы по сравнению с мышами C57BL/6. Так как фукоза в кишечнике является источником энергии для бактерий (Pickard and Chervonsky, 2015), и нарушение фукозилирования может приводить к

изменению микрофлоры (Kashyap et al., 2013), у животных с дефицитом этого моносахарида могут также наблюдаться изменения микрофлоры. И действительно, в нашей лаборатории в.н.с. Кожевниковой Е.Н. было показано, что состав бактериального сообщества кишечника *Muc2*^{-/-} мышей значительно отличался от микрофлоры C57BL/6 (неопубликованные данные). Помимо этого, есть данные о том, что кишечная микрофлора *Muc2*^{-/-} мышей отличается от *Muc2*^{+/+} (Wu et al., 2018).

Итак, полученные данные говорят о том, что, несмотря на дефект барьерной функции, в кишечнике у мышей *Muc2*^{-/-} в возрасте 8-12 недель не наблюдается острого воспалительного процесса. Тесный контакт клеток организма с кишечной микрофлорой приводит к развитию в кишечнике хронического воспаления в неактивной фазе, таким образом, иммунная система и микрофлора, вероятно, находятся в относительно сбалансированном состоянии. Однако такое состояние может быть нарушено при сильном изменении микрофлоры, например при воздействии антибиотиками.

4.2. Обеднение кишечной микрофлоры и снижение жизнеспособности *Muc2*^{-/-} мышей с инфекциями

Следующим этапом исследования было воздействие на микрофлору мышей антибиотиками широкого спектра действия (смесь кларитромицина, метронидазола, амоксициллина). Ранее в нашей лаборатории было показано, что лечение инфекции *Helicobacter* spp. антибиотиками широкого спектра действия у мышей с нарушением барьерной функции кишечника (мыши с двумя мутациями в генах *Muc2* и *Kaiso* – *Muc2*^{-/-}*Kaiso*^{-/-}) приводило к гибели 60% животных. При этом мыши с нормальной барьерной функцией выживали и избавлялись от инфекции (Литвинова и др., 2015). В данной работе этот эффект антибиотиков был воспроизведен и на мышах *Muc2*^{-/-}, положительных на инфекцию *Helicobacter* spp. При этом к концу эксперимента мутантные мыши демонстрировали сильное истощение, около 37% мышей погибали. Однако, 100% мышей C57BL/6 выживали и восстанавливались к концу эксперимента восстанавливались. Интересный результат был получен при добавлении к антибиотикам моносахарида L-фукозы, содержание которого в кишечнике у *Muc2*^{-/-} мышей было снижено. L-фукоза способствовала восстановлению и выживанию 100%

мутантных мышей. Известно, что фукоза в кишечнике может влиять на микрофлору, выступая в качестве источника энергии и регулятора экспрессии генов у бактерий (Pacheco et al., 2012; J. M. Pickard et al., 2014).

Мы предположили, что гибель мутантных мышей, а также эффект L-фукозы на их выживание, могут быть связаны с изменениями микрофлоры. Было показано, что в результате воздействия антибиотиков у мышей происходило обеднение микрофлоры кишечника. При этом у выживших мутантных мышей инфекционный агент *Helicobacter* spp. практически не детектировался. Добавление к антибиотикам моносахарида L-фукозы приводило к частичному восстановлению микрофлоры кишечника. У мышей *Muc2*^{-/-} сохранялось общее количество бактерий, симбиотические бактерии *Bacteroides* и *Lactobacillus* spp, а также инфекционный агент *Helicobacter* spp. У мышей C57BL/6 добавление L-фукозы сохраняло общее количество бактерий и *Lactobacillus* spp., но не *Bacteroides* spp. Вероятно, разные эффекты моносахарида связаны с различиями микрофлоры у мышей двух генотипов. Таким образом, добавление L-фукозы действительно оказывало влияние на состав микрофлоры, корректируя эффект антибактериального воздействия. Однако оставалось не ясным, чем была вызвана гибель животных при воздействии антибиотиками. Обширная гибель бактерий от антибиотиков может быть причиной скопления большого количества PAMP (патоген-ассоциированных молекулярных паттернов), что в условиях отсутствия муцина2 может стимулировать сильные провоспалительные реакции. Однако на гистологических срезах толстой кишки не было обнаружено признаков острого воспаления и разрушения ткани (данные опубликованы в статье Achasova et al., 2021, но не представлены в диссертации).

В ходе выполнения работы был обнаружен другой микроорганизм, входящий в состав микрофлоры мышей *Muc2*^{-/-}, но не C57BL/6. Оказалось, что в кишечнике мутантных мышей обитал микроорганизм, принадлежащий к *Tritrichomonas* spp. Филогенетический анализ ДНК обнаруженного микроорганизма показал, что этот вид близок к *Tritrichomonas muris* и *Tritrichomonas musculus*, представителям нормальной кишечной микрофлоры мышей (Baker, 2008). Обнаруженный микроорганизм не детектировался праймерами, специфичными для *T. muris*. При этом стоит отметить, что три последовательности, которые оказались самыми

близкими к ДНК обнаруженного нами простейшего, должны были детектироваться нашими специфичными праймерами для *T. muris*. Таким образом, вероятно, обнаруженный микроорганизм близок, но не идентичен известным простейшим *T. muris* и *T. musculus*. Поскольку данный микроорганизм был также выявлен и у *Muc2^{-/-}* мышей, получавших антибиотики, мы предположили, что гибель мышей также могла быть вызвана присутствием *Tritrichomonas* sp.

Для того чтобы понять роль присутствия *Helicobacter* spp. и *Tritrichomonas* sp. в гибели *Muc2^{-/-}* мышей при воздействии на микрофлору антибиотиками, были проведены эксперименты на мышах, свободных от инфекций. Мышей *Muc2^{-/-}* освободили от инфекции *Helicobacter* spp. путем редеривации (*in vitro* фертилизации с последующей подсадкой эмбрионов суррогатным матерям, свободным от специфических инфекций) (Litvinova et al., 2017), это обеспечило избавление и от *Tritrichomonas* sp. Было показано, что у мутантных мышей, свободных от инфекций, предоставление антибиотиков не вызывало истощения и гибели. Таким образом, присутствие инфекций действительно вносило вклад в наблюдаемый летальный эффект приема антибиотиков у *Muc2^{-/-}* мышей.

Также было обнаружено, что антибиотики влияли на микрофлору мышей несколько иным образом. Наблюдалось снижение бактерий *Bacteroides* spp., но в отличие от предыдущего эксперимента, они сохранялись на детектируемом уровне. Данные различия в реакции микрофлоры на антибиотики могут быть следствием наследования микрофлоры суррогатной матери, которая отличалась от первоначальной микрофлоры *Muc2^{-/-}* мышей. Также стоит отметить, что реакция микрофлоры мышей дикого типа (однопометники *Muc2^{+/+}*), в отличие от мышей C57BL/6, была схожа с реакцией у *Muc2^{-/-}* мышей. В связи с этим, во всех следующих экспериментах были использованы мыши, полученные в результате скрещивания *Muc2^{+/-}*, что позволило минимизировать материнские эффекты на микрофлору.

4.3. Влияние инфекций на иммунный статус мышей *Muc2^{-/-}*

Поскольку известно, что микрофлора влияет на формирование иммунной системы (Gensollen et al., 2016), мы исследовали иммунный статус мышей, рожденных с инфекциями и без инфекций. Был проведен сравнительный анализ мышей *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}*, полученных в результате скрещивания гетерозиготных

мышей. Такой подход позволил более точно оценить эффекты дефицита муцина2 и присутствия инфекций на иммунную систему. Качественный анализ микрофлоры мышей методом SSCP ДНК 16S rRNA показал, что бактериальный состав в фекалиях у этих мышей, практически выравнивался. Метагеномный анализ микрофлоры *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями и без них также показал, что доминирующие таксоны у мышей с интактной микрофлорой не отличались. Однако другие исследователи демонстрировали различия состава микрофлоры у мышей *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}* при помощи метагеномного анализа (Wu et al., 2018). В другом исследовании, проведенном в нашей лаборатории, метагеномный анализ методом секвенирования ампликонов ДНК 16S rRNA также выявил различия между микрофлорой *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}* мышей. Очевидно, метод исследования микрофлоры путем секвенирования ампликонов является более чувствительным, нежели анализ SSCP. Более того, микрофлора *Muc2^{+/+}*, полученных в результате гетерозиготного скрещивания, отличалась от микрофлоры инбредной линии C57BL/6 (Litvinova et al., 2021), что указывает на целесообразность использования однопометников *Muc2^{+/+}* в качестве контрольной группы в настоящем исследовании. Таким образом, можно заключить, что используемая схема скрещивания действительно снизила материнские эффекты на микрофлору, и все различия, очевидно, являются следствием дефицита муцина2. Так, оказалось, что у мышей *Muc2^{+/+}* была значительно снижена колонизация *Tririchomonas* sp. (но не *Helicobacter* spp.), вероятно, наличие муцина2 может препятствовать заселению кишечника простейшими.

Виды *Helicobacter* spp. (в частности, *H. hepaticus*) считаются патобионтами, т.е. как правило, проявляют свои патогенные свойства лишь при наличии дефектов иммунной функции, либо в особых условиях среды. Было показано, что эти бактерии могут индуцировать регуляторные Т-клетки, которые защищают мышей от развития кишечного воспаления (Kullberg et al., 2002). Вероятно, у *H. hepaticus* есть механизмы, обеспечивающие поддержание непатогенных, симбиотических отношений с организмом хозяина (Chow and Mazmanian, 2010). Также есть данные о том, что эти бактерии способны снижать активацию Toll-like рецепторов (Sterzenbach et al., 2007). Таким образом, бактерии *Helicobacter* spp., присутствующие в организме с рождения, могут выступать в роли симбионтов,

оказывая влияние на формирование иммунной системы. Присутствие в составе микрофлоры микроорганизмов *T. muris* и *T. musculus* также может оказывать эффекты на развитие и функциональное состояние иммунной системы. Известно, что в присутствии данных микроорганизмов активируются провоспалительные иммунные реакции и повышается чувствительность к колиту (Chudnovskiy et al., 2016; Escalante et al., 2016).

Исследование лимфоцитов мезентериальных лимфатических узлов показало, что у *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями процент $CD25^+Foxp3^+$ регуляторных Т-клеток среди $CD4^+$ был выше, чем у мышей без инфекций. Такие различия, вероятно, обуславливались повышенной экспрессией белка *Foxp3* в $CD4^+$ -клетках. Данные результаты согласуются с полученными в эксперименте №1 данными об увеличении экспрессии гена *Foxp3* в кишечнике у *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями. Возможно, *Helicobacter* spp. активирует регуляторную функцию Т-клеток у мышей, что может препятствовать развитию сильных иммунных ответов на микрофлору. В литературе есть данные о толерогенных свойствах бактерий *Helicobacter* spp., в частности, о способности этих бактерий стимулировать наработку противовоспалительного цитокина IL-10 (Arnold et al., 2015; Kullberg et al., 1998) и активировать регуляторные Т-клетки (Altobelli et al., 2019; Kullberg et al., 2002; Lundgren et al., 2005). При этом не исключено, что без воздействия антибиотиков инфекция *Helicobacter* spp. может благоприятно влиять на состояние мышей *Muc2^{-/-}* за счет стимуляции регуляторной функции. В ходе нашего исследования мы обнаружили, что у мышей *Muc2^{-/-}*, свободных от инфекций, выпадение прямой кишки обнаруживается в более раннем возрасте и значительно чаще, чем у мышей с инфекцией *Helicobacter* spp. Также было отмечено, что плодовитость мышей *Muc2^{-/-}* без инфекций ниже, чем у мышей с *Helicobacter* spp. (неопубликованные данные).

Исследование иммунных клеток в селезенке мышей не выявило эффектов генотипа и присутствия инфекций. В то же время в крови у мутантных мышей с инфекциями было обнаружено больше $CD3^+CD4^+$ -клеток, чем у мутантных мышей без инфекций и мышей дикого типа. Эти изменения сочетались с увеличением количества IgG в крови у мутантных мышей по сравнению с мышами дикого типа, но данный эффект наблюдался как у мышей с инфекциями, так и без

них. Такой результат согласуется с данными, полученными в эксперименте №1, и может говорить о том, что у мутантных мышей происходит активация специфического иммунитета вследствие тесного контакта с кишечной микрофлорой.

Таким образом, генетически обусловленный дефицит *Muc2* и связанное с этим нарушение барьера в кишечнике, и присутствие инфекций на этом фоне, способствует формированию особенностей иммунной системы. Обнаруженные особенности, вероятно, имеют адаптационный характер и способствуют поддержанию хронического воспаления в кишечнике в неактивной фазе на фоне присутствия инфекционных агентов.

4.4. Влияние L-фукозы на колонизацию кишечника *Tritrichomonas* sp. и жизнеспособность *Muc2*^{-/-} мышей на фоне обеднения кишечной микрофлоры

На заключительном этапе работы были исследованы эффекты воздействия антибиотиков и антибиотиков в сочетании с L-фукозой на мышей, рожденных с инфекциями и без них. Мыши без инфекций не демонстрировали ухудшение состояния и истощение после обеднения микрофлоры антибиотиками. В связи с этим мы решили проверить, будет ли угнетение обеих инфекций отменять негативный эффект обеднения микрофлоры у мутантных мышей. Для этого мы в течение двух недель вводили мышам раз в сутки высокую дозу антибиотиков, которая обеспечила значительное угнетение *Tritrichomonas* sp., но не *Helicobacter* spp. Оказалось, что угнетение *Tritrichomonas* sp. действительно было ассоциировано с восстановлением мутантных мышей при приеме антибиотиков. Таким образом, негативный эффект антибиотиков наблюдался на фоне обеднения бактериальной микрофлоры именно в присутствии этого простейшего.

Поскольку в первых экспериментах мы наблюдали спасение мутантных мышей от гибели при помощи добавления L-фукозы, далее мы решили проверить, как будет влиять на угнетение *Tritrichomonas* sp. добавление этого моносахарида к антибиотикам. В этом эксперименте первую неделю антибиотики вводили мышам внутрижелудочно, что приводило к угнетению как *Tritrichomonas* sp., так и *Helicobacter* spp. (данные, получены после семи дней внутрижелудочного введения). На вторую неделю антибиотики добавляли в питьевую воду, таким

образом, мыши получали более низкую дозу антибиотиков. При этом L-фукозу предоставляли с питьевой водой в течение двух недель. В результате такого воздействия полученный ранее эффект антибиотиков подтверждался. На 14-15 день эксперимента 50% мышей *Muc2^{-/-}*, рожденных с инфекциями, демонстрировали сильное истощение (теряли до 35% от первоначальной массы тела) и были выведены из эксперимента. Такой эффект сочетался с разрастанием *Tritrichomonas* sp. до уровня, сравнимого с первоначальным. При этом, как и было показано ранее, добавление L-фукозы способствовало восстановлению мышей. Интересно, что наблюдаемый эффект улучшения состояния мышей добавлением L-фукозы сочетался со сдерживанием разрастания *Tritrichomonas* sp. после добавления антибиотиков в воду. Об этом свидетельствовало снижение количества ДНК в фекалиях, а также в ткани толстой кишки (данные представлены в Приложении №14). Таким образом, моносахарид L-фукоза оказывал влияние на колонизацию кишечника простейшим.

Простейшие *Tritrichomonas* и *Trichomonas* при инфицировании взаимодействуют с клетками организма хозяина, адгезия микроорганизмов осуществляется за счет различных механизмов. В литературе практически отсутствуют данные о механизмах адгезии *Tritrichomonas muris*, гораздо лучше изучены *Tritrichomonas foetus* и *Trichomonas vaginalis* (Tolbert and Gookin, 2016). Например, у *T. foetus* обнаружен лектин, связывающий сиаловую кислоту (Sialic acid-binding lectin), за счет этого микроорганизм может использовать для адгезии сиаловую кислоту на клетках хозяина. При этом инкубация с сиаловой кислотой, а также с ферментом сиалидазой, способствовала снижению адгезии *T. foetus* к клеткам (Babál and Russell, 1999). Также в состав мембраны простейших входят липофосфогликаны, которые могут связываться с лектинами хозяина, например, галектином-1 (galectin-1) (Okumura et al., 2008). Если клетки были обработаны очищенными липофосфогликанами, или эти компоненты были модифицированы, адгезивная способность микроорганизма снижалась (Bastida-Corcuera et al., 2005; Singh et al., 1999). Интересно, что в состав липофосфогликанов и других поверхностных антигенов *T. foetus* входят различные моносахариды, в том числе фукоза (Shaia et al., 1998; Singh, 1993; Singh et al., 2001). Помимо этого, гликаны простейших содержат маннозу, которая может связываться со связывающим

маннозу лектином (Mannose-binding lectin) хозяина, и возможно, также может способствовать адгезии (Chatterjee et al., 2015). Таким образом, в адгезию и патогенез простейших *Trichomonas* spp. вовлечены различные сахараиды, и от доступности рецепторов для связывания сахараидов может зависеть эффективность этих процессов. Можно предположить, что L-фукоза может ингибировать взаимодействие микроорганизмов с клетками организма хозяина, частично блокируя места связывания сахараидов. К сожалению, о роли моносахарида L-фукозы в адгезии простейших неизвестно, но есть данные о том, что этот моносахарид может связываться с различными лектинами (Lee et al., 2011). Однако для проверки данной гипотезы необходимо провести дополнительные эксперименты *in vitro*.

4.5. Влияние L-фукозы и антибиотиков на бактериальную микрофлору кишечника *Muc2*^{-/-} мышей

Muc2^{-/-} мыши, рожденные с инфекциями и без инфекций, реагировали на антибиотики по-разному, вероятно, такая реакция обуславливалась присутствием инфекций на фоне обедненной бактериальной микрофлоры кишечника. В связи с этим, мы исследовали изменения бактериальной микрофлоры под действием антибиотиков. Помимо этого, ранее мы обнаружили, что L-фукоза способствует частичному восстановлению симбиотической микрофлоры мышей (эксперимент №1), что также могло вносить вклад в восстановление мышей.

Метагеномный анализ *Muc2*^{-/-} мышей показал, что бактериальная микрофлора мышей реагировала на прием антибиотиков по-разному, в зависимости от присутствия инфекций. У мышей, свободных от инфекций, под действием антибиотиков разнообразие микрофлоры снижалось, при этом начинали преобладать *Proteobacteria*. У *Muc2*^{-/-} мышей с инфекциями, разнообразие микрофлоры, наоборот, увеличивалось. Начинали детектироваться различные минорные таксоны. Бактерии, принадлежащие к типу *Proteobacteria*, ассоциированы с дисбиозами различного происхождения, считается, что они принимают участие в патогенезе различных заболеваний (Shin et al., 2015). Одним из представителей *Proteobacteria* является бактерия *E. coli*, которая входит в состав нормальной симбиотической микрофлоры. Однако чрезмерное разрастание этой бактерии, в особенности патогенных штаммов, может приводить к

болезненным состояниям, сопровождающимся воспалением в кишечнике. Есть данные о том, что эти бактерии вносят вклад в дисбиоз при ВЗК (Mirsepassi-Lauridsen et al., 2019). В нашем эксперименте бактерия *E. coli*, которая практически не детектировалась у мутантных мышей в интактном состоянии, разрасталась при воздействии антибиотиков. При этом рост *E. coli* наблюдался как у животных с инфекциями, так и без них (данные представлены в Приложении №13). Однако, мутантные мыши без инфекций демонстрировали восстановление через две недели приема антибиотиков, даже несмотря на дисбиоз.

Основываясь на данных, полученных в эксперименте №2, мы предполагали, что добавление L-фукозы будет частично компенсировать изменения бактериальной микрофлоры, вызванные антибиотиками. Однако микрофлора мутантных мышей с инфекциями, получавших L-фукозу с антибиотиками, не отличалась по разнообразию от группы, получавшей лишь антибиотики. При этом количественный анализ микрофлоры подтвердил снижение общего количества бактерий под воздействием антибиотиков, и добавление L-фукозы не способствовало восстановлению бактерий (данные представлены в Приложении №13). В другом исследовании, проведенном в нашей лаборатории, было показано, что L-фукоза может корректировать дисбиоз, развившийся на фоне хронического колита (Borisova, Snytnikova, et al., 2020). Таким образом необходимы дополнительные исследования L-фукозы в качестве модулятора бактериальной микрофлоры. Вероятно, эффект L-фукозы на микрофлору зависит от первоначального бактериального состава, от способности бактерий использовать этот моносахарид. Стоит отметить, что в качестве модулятора микрофлоры L-фукоза, а также ее полимер фукоидан, содержащийся в морских водорослях, исследовались и в работах других авторов (Liu et al., 2018; Shang et al., 2016; Shi et al., 2017; G. Wu et al., 2018). Из-за ее способности изменять микрофлору, исследование L-фукозы в качестве пребиотика может иметь хорошее прикладное значение, однако следует подробно изучить ее свойства, поскольку не исключены негативные последствия ее воздействия на микрофлору. Например, есть данные о том, что некоторые патогенные бактерии могут использовать этот моносахарид в кишечнике и разрастаться после обеднения симбиотической микрофлоры антибиотиками (Ng et al., 2013).

4.6. Влияние L-фукозы на иммунный статус мышей *Muc2^{-/-}* при обеднении бактериальной микрофлоры

Гибель бактерий при антибактериальном воздействии может сопровождаться накоплением большого количества токсинов. Сепсис бактериальными токсинами может быть одним из серьезных осложнений после приема антибиотиков (Holzheimer, 2001). Помимо этого, присутствие простейшего на фоне обеднения бактериальной микрофлоры также может приводить к повышенному воздействию антигенов и токсинов на организм. Известно, что кишечная микрофлора участвует в метаболизме различных ксенобиотиков (Collins and Patterson, 2020), может быть вовлечена в метаболизм пищевых токсинов (Kohl and Dearing, 2016), а также способствует защите организма хозяина от колонизации патогенов и воздействия их токсинов (Asahara et al., 2004; Liévin-Le Moal and Servin, 2006). В условиях нарушенного барьера в кишечнике обеднение микрофлоры может оказывать еще более негативные эффекты на организм. Ранее на модели нарушения барьерной функции в кишечнике, индуцированном DSS, было показано, что воздействие антибиотиков приводило к дисбиозу и гибели мышей от сепсиса, вызванного патогенным штаммом *E.coli* (Ayres et al., 2012). Учитывая нарушенный барьер и повышенную проницаемость кишечника *Muc2^{-/-}* мышей, мы не могли исключить, что ухудшение состояния животных могло быть связано с интоксикацией и сепсисом.

Одним из широко используемых маркеров сепсиса и нарушения работы внутренних органов является повышение уровня лактата в крови (Faix, 2013). Однако уровень лактата в крови у мышей не менялся при воздействии антибиотиков и L-фукозы во всех экспериментальных группах. Исследование содержания в крови у мышей внутриклеточных ферментов показало, что прием антибиотиков приводил к увеличению концентрации аланинаминотрансферазы (АЛТ) в крови у мутантных мышей независимо от присутствия инфекций. Интересно, что у *Muc2^{-/-}* мышей с инфекциями также наблюдалось повышение аспартатаминотрансферазы (АСТ). Увеличение концентрации данных ферментов в крови является маркером обширной гибели клеток различных внутренних органов, в том числе печени (Evans, 2009). Вероятно, прием антибиотиков оказывал цитотоксический эффект на организм мутантных мышей, однако, у

Muc2^{-/-} мышей с инфекциями такой негативный эффект проявлялся сильнее. Такое действие антибиотиков скорее всего было обусловлено нарушением барьера и повышенной проницаемостью кишечника у мутантных мышей. Согласно нашим результатам, мыши дикого типа с нормальной барьерной функцией не демонстрировали повышение концентрации данных ферментов (данные представлены в Приложении №9), что также согласуется с данными литературы (Schneider et al., 2019). Интересно, что повышение АСТ у мутантных мышей с инфекциями отменялось добавлением L-фукозы. Можно предположить, что данный фермент повышался из-за повышенной нагрузки на организм, обусловленной присутствием микроорганизма *Tritrichomonas* sp. на фоне дисбиоза. Угнетение инфекции при добавлении к антибиотикам L-фукозы может объяснять отмену увеличения концентрации АСТ у этих животных. Таким образом, прием антибиотиков вызывал дисбиоз кишечника и оказывал цитотоксическое действие на организм.

Дисбиоз в кишечнике может оказывать значительные эффекты на иммунную систему, считается, что нарушение микрофлоры может способствовать развитию воспалительных реакций в кишечнике (Matsuoka and Kanai, 2015). В нашем исследовании было обнаружено, что предоставление антибиотиков вызывает увеличение количества провоспалительного цитокина IL-1 β в ткани толстой кишки у мутантных мышей независимо от присутствия инфекций. При этом добавление L-фукозы нивелировало данный эффект, но только у животных, рожденных с инфекциями. Некоторые исследования демонстрируют противовоспалительные свойства веществ, содержащих фукозу (фукоидана и фукозилированного хондроитинсульфата) (Hu et al., 2019; Lee et al., 2013; Shi et al., 2017). Помимо этого, недавно было показано, что фукоидан и моносахарид L-фукоза способствуют облегчению колита, индуцированного DSS, за счет угнетения провоспалительных реакций в кишечнике (He et al., 2019; Ke et al., 2020; Lean et al., 2015). При этом, согласно результатам исследования, проведенного в нашей лаборатории, L-фукоза не оказывала противовоспалительного эффекта в кишечнике у мышей с DSS-индуцированным колитом (Borisova, Snytnikova, et al., 2020). В настоящем исследовании активация провоспалительных реакций у мутантных мышей, вероятно, была вызвана разными микробиологическими

факторами, и эффект L-фукозы на провоспалительный цитокин был обусловлен влиянием моносахарида на микрофлору мышей с инфекциями.

Интересный эффект был получен при исследовании лимфоцитов в мезентериальных лимфоузлах. Оказалось, что прием антибиотиков приводил к снижению процента и количества регуляторных Т-клеток у мышей независимо от присутствия инфекций и генотипа. Но интересно, что добавление L-фукозы способствовало ослаблению влияния антибиотиков на количество регуляторных Т-клеток, а также общего количества клеток в лимфоузлах у мутантных мышей с инфекциями, но не у свободных от инфекций мышей. Известно, что обеднение микрофлоры может приводить к угнетению иммунной функции, например, за счет влияния на гемопоэз в красном костном мозге (Josefsdottir et al., 2017; Staffas et al., 2018), а также оказывая эффекты на метаболизм хозяина (Yang et al., 2017). Помимо этого, мы обнаружили увеличение концентрации АЛТ и АСТ в крови после приема антибиотиков, что может быть признаком обширной гибели клеток. Таким образом, наблюдаемое в наших экспериментах снижение лейкоцитов в крови, а также уменьшение клеточности тимуса, селезенки и лимфоузлов, могут быть следствием такой цитотоксичности и подавления иммунной функции при обеднении кишечной микрофлоры. Такой эффект на клеточность органов иммунной системы сочетался с увеличением процента $CD3^+CD8^+$ Т-клеток в селезенке и крови у *Muc2^{-/-}* мышей. Однако гибель при обеднении микрофлоры демонстрировали лишь мутантные животные, рожденные с инфекциями. Вероятно, этот летальный эффект мог быть вызван совокупностью нескольких факторов, обусловленных дисбиозом.

Например, известно, что кишечная микрофлора помогает организму хозяина получать энергию, а угнетение микрофлоры антибиотиками приводит к снижению количества энергии, получаемой организмом (Staffas et al., 2018). Поскольку иммунные реакции достаточно энергоемкие, можно предположить, что у мышей с нарушенной барьерной функцией потребность в энергии будет выше, чем у животных с нормальным барьером в кишечнике. А обеднение микрофлоры в сочетании с наблюдаемой активацией провоспалительных реакций может дополнительно увеличить потребность организма в энергии. Таким образом, можно предположить, что причиной истощения мышей может быть и недостаток

энергии для поддержания жизнедеятельности. Однако для проверки этого предположения необходимо провести исследование особенностей метаболизма *Muc2*^{-/-} мышей в интактном состоянии, а также на фоне приема антибиотиков.

Причиной активации провоспалительных реакций могло быть не только само по себе нарушение микрофлоры, но и присутствие простейшего на фоне дисбиоза. Микроорганизмы *T. muris* и *T. musculus* и их роль в активации иммунной системы начали изучать совсем недавно, однако уже есть данные о том, что эти микроорганизмы могут стимулировать провоспалительные реакции. Например, было показано, что *T. muris* может стимулировать Th2 иммунный ответ (наработку IL-13), а также эозинофилию в тонкой кишке мышей через наработку IL-25 эпителиальными клетками (Howitt et al., 2016). В другой работе было показано, что инфекция этим микроорганизмом стимулирует CD4⁺INFγ⁺ Т-клетки, а также снижает RORγt⁺ регуляторные Т-клетки в слепой кишке, что может свидетельствовать о сдвиге иммунной функции кишечника от толерогенной в провоспалительную сторону (Escalante et al., 2016). Еще в одном исследовании было продемонстрировано, что *T. musculus* способен стимулировать Th1 и Th17 иммунные ответы в толстой кишке через активацию инфламмосомы и наработку IL-18 эпителиальными клетками (Chudnovskiy et al., 2016). При этом присутствие этих микроорганизмов может повышать чувствительность мышей к колиту, индуцированному переносом эффекторных Т-клеток (Chudnovskiy et al., 2016; Escalante et al., 2016). Учитывая эти данные, очень интересно, что в присутствии простейшего у мышей с нарушенной барьерной функцией, но интактной микрофлорой, наблюдалось увеличение представленности регуляторных Т-клеток в лимфатических узлах. Особенности иммунной функции в ткани кишечника у животных, рожденных с инфекциями и без, в данной работе изучить не удалось. Но основываясь на результатах анализа мезентериальных лимфоузлов, можно предположить, что в присутствии инфекций *Helicobacter* spp. и *Tritrichomonas* sp. в кишечнике у мышей была активирована толерогенная функция. Возможно, это было обусловлено присутствием именно бактерий *Helicobacter* spp., которые могут активировать регуляторные Т-клетки (Arnold et al., 2015; Kullberg et al., 1998, Kullberg et al. 2002). Дальнейшее изучение этих двух микроорганизмов, их влияния на иммунную систему, как вместе, так и по отдельности, может

способствовать расширению знаний о влиянии кишечной микрофлоры на функцию иммунной системы хозяина.

4.7. Прикладная значимость полученных результатов

В данной работе была исследована роль муцина2 и его компонента L-фукозы в регуляции барьерной функции кишечника, в частности, в регуляции микрофлоры и функции иммунной системы мышей с нокаутом гена *Muc2* на фоне обеднения бактериального состава кишечника. Мутантные мыши, рожденные с микроорганизмами *Helicobacter* spp. и *Tritrichomonas* sp., оказались более чувствительны к воздействию антибиотиков, чем мыши без инфекций. Это выражалось в истощении и смертности животных, а также активации провоспалительных реакций и подавлении регуляторной функции иммунной системы. Полученные данные указывают на то, что в условиях генетически обусловленных нарушений барьера в кишечнике, особенности первоначальной микрофлоры могут обуславливать разные, в том числе и негативные, эффекты применения антибиотиков.

Антибиотики широко применяются в медицине, в том числе они активно используются при терапии ВЗК. Есть данные о том, что антибактериальная терапия, в том числе и в детском возрасте, может быть фактором риска развития ВЗК, в основном обнаружены ассоциации антибактериальной терапии с развитием болезни Крона (Hviid et al., 2011; Kronman et al., 2012; Li et al., 2016; Shaw et al., 2010, 2011; Ungaro et al., 2014; Virta et al., 2012). Помимо этого, наличие различных бактериальных инфекций также может быть фактором риска развития данных заболеваний (Axelrad et al., 2019; Gradel et al., 2009). Использование антибактериальной терапии при ВЗК, ее особенности, эффективность и целесообразность, постоянно исследуются, обсуждаются и пересматриваются. В настоящее время специалисты склонны считать, что постоянное применение антибиотиков при болезни Крона и язвенном колите нежелательно, не только из-за растущей резистентности к антибиотикам, но и из-за многочисленных побочных эффектов такой терапии (Ledder, 2019; Ledder and Turner, 2018; Nitzan et al., 2016). В связи с этим в литературе широко обсуждается необходимость уточнения существующих способов терапии, а также разработка новых подходов, включающих воздействие, как на кишечную микрофлору, так и на иммунную

функцию. Помимо этого, кажется целесообразной разработка терапевтических подходов, учитывающих индивидуальные микробиологические, иммунные, а также генетические особенности пациента.

Добавление моносахарида L-фукозы к антибиотикам предотвращало смертность мышей, оказывая эффекты как на микрофлору (микроорганизм *Tritrichomonas* sp.). К сожалению, точных механизмов действия L-фукозы выявить не удалось, для этого требуются дополнительные исследования. Однако полученные результаты позволяют рассматривать данный моносахарид в качестве модулятора микрофлоры. В настоящее время различные олигосахариды рассматриваются как перспективные вещества для модуляции кишечной микрофлоры за счет различных механизмов, таких как, подавление адгезии патогенных бактерий, стимуляция роста симбиотических бактерий, стимуляция иммунной функции (Gibson et al., 2005; Licht et al., 2012; Sanders et al., 2019). К числу исследуемых олигосахаридов относятся и вещества, содержащие фукозу. Например, исследуются такие вещества, как фукоиданы бурых водорослей. Было показано, что эти вещества могут менять кишечную микрофлору, способствуя росту симбиотических бактерий, в том числе, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты (Liu et al., 2018; Shang et al., 2016; Shi et al., 2017). Таким образом, L-фукоза и содержащие фукозу олигосахариды могут быть интересным объектом для изучения и разработки способов модуляции микрофлоры. Однако, стоит отметить, что эффекты фукозосодержащих веществ показаны на лабораторных грызунах. Известно, что у мышей градиент фукозилирования муцина2 в кишечнике увеличивается в направлении от проксимальных отделов к дистальным, а сиалирование, наоборот, снижается (Holmén-Larsson et al., 2013). При этом, для муцина2 в кишечнике у людей показаны обратные тенденции на снижение фукозилирования и увеличение сиалирования в дистальном направлении (Robbe et al., 2004). Таким образом, в кишечнике у людей эффекты L-фукозы могут быть другими. В связи с этим, необходимы подробные исследования эффектов, которые оказывают на клетки и ткани человека вещества, содержащие фукозу. Помимо этого, следует исследовать и другие сахараиды в качестве модуляторов микрофлоры и иммунной системы.

Также результаты работы указывают на взаимодействия между про- и эукариотическими микроорганизмами и организмом хозяина, на изучение которых стоит обратить внимание. Сейчас в биологии и медицине ведется активное изучение микрофлоры и ее функций в организме хозяина, но в основном изучают бактерии, в то время как эукариотические организмы, в частности простейшие, изучены не так подробно. Однако данные микроорганизмы начинают привлекать внимание исследователей, ученые все больше задумываются о роли простейших в составе микрофлоры (Chabé et al., 2017; Partida-Rodríguez et al., 2017). Дальнейшее изучение всех компонентов микрофлоры, более точное понимание взаимодействий внутри микрофлоры может способствовать совершенствованию методов терапии множества заболеваний, ассоциированных с микрофлорой, и поддержания гомеостаза в кишечнике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью исследования было выявить роль муцина₂ и его структурного компонента L-фукозы в регуляции барьерной функции кишечника. Было установлено, что генетически обусловленное отсутствие муцина₂ у мышей приводит к повышению проницаемости кишечника и развитию хронического воспаления. При этом активация противовоспалительных иммунных реакций и механизмов, направленных на восстановление поврежденной ткани, вероятно, способствует поддержанию хронического воспаления в кишечнике *Muc2*^{-/-} мышей в неактивной фазе. Более того, дефицит муцина₂ снижает устойчивость к колонизации кишечника мышей простейшим *Tritrichomonas* sp. Таким образом, муцин₂ является важным фактором поддержания барьерной функции кишечника.

Известно, что микрофлора кишечника играет важную роль в поддержании гомеостаза в кишечнике, в данном исследовании оценивалась, ее защитная функция в условиях нарушения барьерной функции кишечника. Оказалось, что нарушение бактериальной микрофлоры антибиотиками широкого спектра действия приводило к истощению и гибели мышей с дефицитом муцина₂, но не оказывало такого эффекта на мышей с нормальным мукусным слоем в кишечнике. При этом, такой эффект наблюдался лишь при обеднении бактериальной микрофлоры *Muc2*^{-/-} мышей с инфекциями *Helicobacter* spp. и *Tritrichomonas* sp. Однако, обеднение микрофлоры мутантных мышей, свободных от инфекций, не приводило к истощению и гибели животных. Более того, обеднение бактериальной микрофлоры кишечника *Muc2*^{-/-} мышей в сочетании с угнетением протозойной инфекции, также не приводило к гибели. Таким образом, бактериальная микрофлора играет важную роль в защите от протозойной инфекции при дефиците муцина₂.

Также в данной работе исследовалась роль одного из компонентов муцина₂ – моносахарида L-фукозы в регуляции кишечной микрофлоры и барьерной функции кишечника. Было показано, что добавление к антибиотикам L-фукозы повышает устойчивость к колонизации кишечника мышей *Muc2*^{-/-} микроорганизмом *Tritrichomonas* sp., что сочетается с восстановлением массы тела животных. Также добавление этого моносахарида корригировало негативные эффекты, которые оказывало обеднение микрофлоры антибиотиками на ряд

физиологических показателей мышей *Muc2^{-/-}* с инфекциями (концентрация внутриклеточного фермента АСТ в крови, клеточность и количество регуляторных Т-клеток в мезентериальных ЛУ, уровень провоспалительного цитокина IL-1 β в ткани толстой кишки). Однако, прямого влияния L-фукозы на иммунную систему мышей в данной работе выявлено не было, вероятно, изменение иммунного статуса при приеме L-фукозы и антибиотиков было связано с угнетением протозойной инфекции. Механизмы влияния L-фукозы на *Tritrichomonas* sp. не были выявлены, однако, дальнейшее исследование роли этого моносахарида во взаимодействии простейших рода *Tritrichomonas* могут способствовать разработке новых способов элиминации протозойных инфекций.

ВЫВОДЫ

1. Гликопротеин муцин2 способствует поддержанию барьерной функции кишечника и защищает от развития воспаления. У мышей с генетически обусловленным дефицитом муцина2 (*Muc2^{-/-}*) 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-1b). Помимо этого, при обеднении микрофлоры наблюдается лейкопения, снижение клеточности тимуса и селезенки, а также перераспределение баланса CD4/CD8 в сторону CD8⁺ Т-клеток.
5. Компонент муцина2 моносахарид L-фукоза угнетает простейшее *Tritrichomonas* sp. в кишечнике у *Muc2^{-/-}* 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 корригировала изменение физиологических показателей (повышение IL-1β 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 ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

AMP – antimicrobial peptide (антимикробный пептид)
 CD – cluster of differentiation
 DN – double negative (дубль-негативные клетки)
 DSS – dextran sulfate sodium (декстран сульфат натрия)
 FELASA – the Federation of European Laboratory Animal Science Associations
 Foxp3 – forkhead box P3
 FUT2 – Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 2
 GF – germ-free (свободные от инфекции)
 IgA – иммуноглобулин А
 IgG – иммуноглобулин G
 IL – Interleukin (интерлейкин)
 ILC – Innate Lymphoid Cells
 INF- γ – Interferon gamma (интерферон гамма)
 MAMP – microbe-associated molecular pattern (микроб-ассоциированные молекулярные паттерны)
 NF-kb – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (ядерный фактор «каппа-би»)
 NLR – Nod-like-receptor (Nod-подобный рецептор)
 NOD – nucleotide-binding oligomerization domain
 OUT – operational taxonomic unit
 PAMP – Pathogen-associated molecular pattern (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны)
 PPR – Pattern recognition receptor (Рецепторы опознавания паттерна)
 PSA – Polysaccharide A (полисахарид А)
 RORC – RAR-related orphan receptor gamma
 SDS – Sodium dodecyl sulfate
 SSCP – Single-Strand Conformation Polymorphism
 TGFb – Transforming growth factor beta (Трансформирующий ростовой фактор бета)
 Th – хелперные Т-клетки
 TLR – Toll-like receptor (Toll-подобные рецепторы)
 TNF-a - tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли)
 АЛТ – аланинаминотрансфераза
 АСТ – аспаратаминотрансфераза
 БСА – бычий сывороточный альбумин
 ВЗК – воспалительные заболевания кишечника
 ДК – дендритные клетки
 ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
 ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
 ИФА – иммуноферментный анализ
 мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
 ЛУ – лимфатические узлы
 ОТЕ – оперативная таксономическая единица
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 УКК – условное количество клеток

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Литвинова Е. А., Беляев М. Д., Прохорчук А. В., Коростина В. С., Прохорчук Е. Б., Кожевникова Е. Н. Вклад кишечного муцина-2 в эффективность антибактериальной терапии *Helicobacter* spp. у лабораторных мышей // Вавиловский Журнал Генетики и Селекции. — 2015. — 19(4). — С. 494-498. doi: 10.18699/vj15.066
2. Achasova, K. M., Kozhevnikova, E. N., Borisova, M. A., & Litvinova, E. A. (2021). Fucose Ameliorates *Trichomonas* sp.-Associated Illness in Antibiotic-Treated *Muc2*^{-/-} Mice // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2021. — 22(19). — 10699. doi: 10.3390/IJMS221910699
3. Aliberti J. Immunity and Tolerance Induced by Intestinal Mucosal Dendritic Cells // *Mediators of Inflammation*. — 2016, — 3104727. doi: 10.1155/2016/3104727
4. Alipour, M., Zaidi, D., Valcheva, R., Jovel, J., Martínez, I., Sergi, C., Walter, J., Mason, A. L., Wong, G. K.-S., Dieleman, L. A., Carroll, M. W., Huynh, H. Q., & Wine, E. Mucosal Barrier Depletion and Loss of Bacterial Diversity are Primary Abnormalities in Paediatric Ulcerative Colitis // *Journal of Crohn's & Colitis*. — 2016. — 10(4). — 462–471. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv223
5. Altobelli, A., Bauer, M., Velez, K., Cover, T. L., & Müller, A. *Helicobacter pylori* VacA Targets Myeloid Cells in the Gastric Lamina Propria To Promote Peripherally Induced Regulatory T-Cell Differentiation and Persistent Infection // *MBio*. — 2019. — 10(2). — e00261-19. doi: 10.1128/mBio.00261-19
6. Andersen, V., Ernst, A., Christensen, J., Østergaard, M., Jacobsen, B. A., Tjønneland, A., Krarup, H. B., & Vogel, U. The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohns disease in a Danish case-control study // *BMC Medical Genetics*. — 2010. — 11. — 82. doi: 10.1186/1471-2350-11-82
7. Antonelli, E., Baldoni, M., Giovenali, P., Villanacci, V., Essatari, M., & Bassotti, G. Intestinal superinfections in patients with inflammatory bowel diseases // *Journal of Crohn's and Colitis*. — 2012. — 6(2). — 154–159. doi: 10.1016/j.crohns.2011.07.012
8. Antoni, L., Nuding, S., Wehkamp, J., & Stange, E. F. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease // *World Journal of Gastroenterology*. — 2014. — 20(5). — 1165–1179. doi: 10.3748/wjg.v20.i5.1165
9. Arnold, I. C., Hutchings, C., Kondova, I., Hey, A., Powrie, F., Beverley, P., & Tchilian, E. *Helicobacter hepaticus* infection in BALB/c mice abolishes subunit-vaccine-induced protection against *M. tuberculosis* // *Vaccine*. — 2015. — 33(15). — 1808–1814. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.02.041
10. Artis, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune

- homeostasis in the gut // *Nature Reviews Immunology*. — 2008. — 8(6). — 411–420. doi: 10.1038/nri2316
11. Asahara, T., Shimizu, K., Nomoto, K., Hamabata, T., Ozawa, A., & Takeda, Y. Probiotic Bifidobacteria Protect Mice from Lethal Infection with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 // *Infection and Immunity*. — 2004. — 72(4). — 2240–2247. doi: 10.1128/IAI.72.4.2240-2247.2004
 12. Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I. I., Umesaki, Y., Itoh, K., & Honda, K. Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous *Clostridium* Species // *Science* — 2011. — 331(6015). — 337–341. doi: 10.1126/science.1198469
 13. Axelrad, J. E., Lichtiger, S., & Yajnik, V. Inflammatory bowel disease and cancer: The role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment // *World Journal of Gastroenterology*. — 2016. — 22(20). — 4794. doi: 10.3748/wjg.v22.i20.4794
 14. Axelrad, J. E., Olén, O., Askling, J., Lebwohl, B., Khalili, H., Sachs, M. C., & Ludvigsson, J. F. Gastrointestinal Infection Increases Odds of Inflammatory Bowel Disease in a Nationwide Case–Control Study // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. — 2019. — 17(7). — 1311–1322.e7. doi: 10.1016/j.cgh.2018.09.034
 15. Ayres, J. S., Trinidad, N. J., & Vance, R. E. Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota // *Nature Medicine*. — 2012. — 18(5). — 799–806. doi: 10.1038/nm.2729
 16. Babál, P., & Russell, L. C. Sialic acid-specific lectin-mediated adhesion of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas mobilensis* // *The Journal of Parasitology*. — 1999. — 85(1). — 33–40.
 17. Babickova, J., & Gardlik, R. Pathological and therapeutic interactions between bacteriophages, microbes and the host in inflammatory bowel disease // *World Journal of Gastroenterology*. — 2015. — 21(40). — 11321. doi: 10.3748/wjg.v21.i40.11321
 18. Baker, D. G. Parasites of Rats and Mice. In *Flynn's Parasites of Laboratory Animals*. — Blackwell Publishing Ltd. — 2008. — P: 303–397. Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1002/9780470344552.ch11
 19. Bao, Y., Guo, Y., Li, Z., Fang, W., Yang, Y., Li, X., Li, Z., Xiong, B., Chen, Z., Wang, J., Kang, K., Gou, D., & Yang, W.. MicroRNA profiling in *Muc2* knockout mice of colitis-associated cancer model reveals epigenetic alterations during chronic colitis malignant transformation // *PLoS ONE*. — 2014. — 9(6). doi: 10.1371/journal.pone.0099132
 20. Barber, G. E., Hendler, S., Okafor, P., Limsui, D., & Limketkai, B. N. Rising Incidence of Intestinal Infections in Inflammatory Bowel Disease: A Nationwide Analysis // *Inflammatory*

- Bowel Diseases. — 2018. — 24(8). — 1849–1856. doi: 10.1093/ibd/izy086
21. Barbosa, T., & Rescigno, M. Host-bacteria interactions in the intestine: Homeostasis to chronic inflammation // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. — 2010. — 2(1). — 80–97. doi: 10.1002/wsbm.48
 22. Barnes, M. J., & Powrie, F. Regulatory T Cells Reinforce Intestinal Homeostasis // *Immunity*. — 2009. — 31(3). — 401–411. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.011
 23. Bassam, B. J., & Gresshoff, P. M. Silver staining dna in polyacrylamide gels // *Nature Protocols*. — 2007. — 2(11). — 2649–2654. doi: 10.1038/nprot.2007.330
 24. Bastida-Corcuera, F. D., Okumura, C. Y., Colocoussi, A., & Johnson, P. J. *Trichomonas vaginalis* Lipophosphoglycan Mutants Have Reduced Adherence and Cytotoxicity to Human Ectocervical Cells // *Eukaryotic cell*. — 2005. — 4(11). — 1951–1958. doi: 10.1128/EC.4.11.1951-1958.2005
 25. Bell, S. J., Chisholm, S. A., Owen, R. J., Borriello, S. P., & Kamm, M. A. Evaluation of *Helicobacter* species in inflammatory bowel disease // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. — 2003. — 18(5). — 481–486.
 26. Benjamin, J. L., Hedin, C. R. H., Koutsoumpas, A., Ng, S. C., McCarthy, N. E., Hart, A. L., Kamm, M. A., Sanderson, J. D., Knight, S. C., Forbes, A., Stagg, A. J., Whelan, K., & Lindsay, J. O. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn's disease // *Gut*. — 2011. — 60(7). — 923–929. doi: 10.1136/gut.2010.232025
 27. Bergstrom, K. S. B., Kisooson-Singh, V., Gibson, D. L., Ma, C., Montero, M., Sham, H. P., Ryz, N., Huang, T., Velcich, A., Finlay, B. B., Chadee, K., & Vallance, B. A. Muc2 Protects against Lethal Infectious Colitis by Disassociating Pathogenic and Commensal Bacteria from the Colonic Mucosa // *PLoS Pathogens*. — 2010. — 6(5). — e1000902. doi: 10.1371/journal.ppat.1000902
 28. Bergstrom, K. S. B., & Xia, L.. Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis // *Glycobiology*. — 2013. — 23(9). — 1026. doi: 10.1093/GLYCOB/CWT045
 29. Bilsborough, J., Targan, S. R., & Snapper, S. B. Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease: Current and Future // *The American Journal of Gastroenterology Supplements*. — 2016. — 3(3). — 27-37. doi: 10.1038/ajgsup.2016.18
 30. Bodger, K., Halfvarson, J., Dodson, A. R., Campbell, F., Wilson, S., Lee, R., Lindberg, E., Järnerot, G., Tysk, C., & Rhodes, J. M. Altered colonic glycoprotein expression in unaffected monozygotic twins of inflammatory bowel disease patients // *Gut*. — 2006. — 55(7). — 973–977. doi: 10.1136/gut.2005.086413
 31. Borisova, M. A., Achasova, K. M., Morozova, K. N., Andreyeva, E. N., Litvinova, E. A., Ogienko, A. A., Morozova, M. V., Berkaeva, M. B., Kiseleva, E., & Kozhevnikova, E. N.

- Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium // *Scientific Reports*. — 2020. — 10(1). — 1–17. doi: 10.1038/s41598-020-78141-4
32. Borisova, M. A., Snytnikova, O. A., Litvinova, E. A., Achasova, K. M., Babochkina, T. I., Pindyurin, A. V., Tsentalovich, Y. P., & Kozhevnikova, E. N. Fucose Ameliorates Tryptophan Metabolism and Behavioral Abnormalities in a Mouse Model of Chronic Colitis // *Nutrients*. — 2020. — 12(2). — 445. doi: 10.3390/nu12020445
 33. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. — 1976. — 72. — 248–254.
 34. Buffie, C. G., & Pamer, E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens // *Nature Reviews. Immunology*. — 2013. — 13(11). — 790–801. doi: 10.1038/nri3535
 35. Buhner, S., Buning, C., Genschel, J., Kling, K., Herrmann, D., Dignass, A., Kuechler, I., Krueger, S., Schmidt, H. H.-J., & Lochs, H. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? // *Gut*. — 2006. — 55(3). — 342–347. doi: 10.1136/gut.2005.065557
 36. Burger-van Paassen, N., van der Sluis, M., Bouma, J., Korteland-van Male, A. M., Lu, P., Van Seuningen, I., Boehm, G., van Goudoever, J. B., & Renes, I. B. Colitis development during the suckling-weaning transition in mucin Muc2-deficient mice // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. — 2011. — 301(4). — G667–G678. doi: 10.1152/ajpgi.00199.2010
 37. Burich, A., Hershberg, R., Waggie, K., Zeng, W., Brabb, T., Westrich, G., Viney, J. L., & Maggio-Price, L. Helicobacter -induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. — 2001. — 281(3). — G764–G778. doi: 10.1152/ajpgi.2001.281.3.G764
 38. Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., & Chadee, K. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. — 2007. — 292(1). doi: 10.1152/ajpgi.00265.2006
 39. Cahill, R. J., Foltz, C. J., Fox, J. G., Dangler, C. A., Powrie, F., & Schauer, D. B. Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus* // *Infection and Immunity*. — 1997. — 65(8). — 3126–3131.
 40. Casellas, F., Borrueal, N., Torrejón, A., Varela, E., Antolin, M., Guarner, F., & Malagelada, J.-R. Oral oligofructose-enriched inulin supplementation in acute ulcerative colitis is well

- tolerated and associated with lowered faecal calprotectin // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. — 2007. — 25(9). — 1061–1067. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03288.x
41. Cerf-Bensussan, N., & Gaboriau-Routhiau, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? // *Nature Reviews Immunology*. — 2010. — 10(10). — 735–744. doi: 10.1038/nri2850
 42. Chabé, M., Lokmer, A., & Ségurel, L. Gut Protozoa: Friends or Foes of the Human Gut Microbiota? // In *Trends in Parasitology*. — 2017. — 33(12). — 925–934. doi: 10.1016/j.pt.2017.08.005
 43. Chatterjee, A., Ratner, D. M., Ryan, C. M., Johnson, P. J., O’Keefe, B. R., Secor, W. E., Anderson, D. J., Robbins, P. W., & Samuelson, J. Anti-retroviral lectins have modest effects on adherence of *Trichomonas vaginalis* to epithelial cells in vitro and on recovery of *Tritrichomonas foetus* in a mouse vaginal model // *PLoS ONE*. — 2015. — 10(8). doi: 10.1371/journal.pone.0135340
 44. Chen, K., Magri, G., Grasset, E. K., & Cerutti, A. Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA // *Nature Reviews Immunology*. — 2020. — 20(7). — 427–441. doi: 10.1038/s41577-019-0261-1
 45. Chow, J., & Mazmanian, S. K. A Pathobiont of the Microbiota Balances Host Colonization and Intestinal Inflammation // *Cell Host and Microbe*. — 2010. — 7(4). — 265–276. doi: 10.1016/j.chom.2010.03.004
 46. Chudnovskiy, A., Mortha, A., Kana, V., Kennard, A., Ramirez, J. D., Rahman, A., Remark, R., Mogno, I., Ng, R., Gnjatic, S., Amir, E. ad D., Solovyov, A., Greenbaum, B., Clemente, J., Faith, J., Belkaid, Y., Grigg, M. E., & Merad, M. Host-Protozoan Interactions Protect from Mucosal Infections through Activation of the Inflammasome // *Cell*. — 2016. — 167(2). — 444–456.e14. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.076
 47. Cobo, E. R., Eckmann, L., & Corbeil, L. B. Murine models of vaginal trichomonad infections // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. — 2011. — 85(4). — 667–673. doi: 10.4269/ajtmh.2011.11-0123
 48. Cohen, B. L., & Sachar, D. B. Update on anti-tumor necrosis factor agents and other new drugs for inflammatory bowel disease // *BMJ*. — 2017. — 357. — j2505. doi: 10.1136/bmj.j2505
 49. Collins, S. L., & Patterson, A. D. The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. — 2020. — 10(1). — 19–32. doi: 10.1016/j.apsb.2019.12.001
 50. Coombes, J. L., & Powrie, F. Dendritic cells in intestinal immune regulation // *Nature Reviews Immunology*. — 2008. — 8(6). — 435–446. doi: 10.1038/nri2335
 51. Costa, A. S. Da, Graham, T. M., Duncan, J. A., Pillai, S. P. S., & Lund, J. M. Detection and

- treatment strategy for *Tritrichomonas muris* in the common laboratory mouse // *BioRxiv*. — 2019. — 827055. doi: 10.1101/827055
52. Council Directive 86/609/EEC on the approximation of laws, regulations, and administrative provisions of the member states regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes., 1 (1986).
 53. Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M., Pudlo, N. A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V. B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T. S., Núñez, G., & Martens, E. C. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility // *Cell*. — 2016. — 167(5). — 1339-1353.e21. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.043
 54. Dimasuay, K. G. B., & Rivera, W. L. Molecular characterization of trichomonads isolated from animal hosts in the Philippines // *Veterinary Parasitology*. — 2013. — 196(3–4). — 289–295. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.03.019
 55. Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O’Connell, T. M., Bunger, M. K., & Bultman, S. J. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon // *Cell Metabolism*. — 2011. — 13(5). — 517–526. doi: 10.1016/j.cmet.2011.02.018
 56. Dorofeyev, A. E., Vasilenko, I. V, Rassokhina, O. A., & Kondratiuk, R. B. Mucosal barrier in ulcerative colitis and Crohn’s disease // *Gastroenterology Research and Practice*. — 2013. — 431231. doi: 10.1155/2013/431231
 57. Duboc, H., Rajca, S., Rainteau, D., Benarous, D., Maubert, M. A., Quervain, E., Thomas, G., Barbu, V., Humbert, L., Despras, G., Bridonneau, C., Dumetz, F., Grill, J. P., Masliah, J., Beaugerie, L., Cosnes, J., Chazouillères, O., Poupon, R., Wolf, C., ... Seksik, P. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and Gut inflammation in inflammatory bowel diseases // *Gut*. — 2013. — 62(4). — 531–539. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302578
 58. Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., Steinhart, A. H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L. W., Kistner, E. O., Schumm, L. P., Lee, A. T., Gregersen, P. K., ... Cho, J. H. A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene // *Science*. — 2006. — 314(5804). — 1461–1463. doi: 10.1126/science.1135245
 59. Eberl, G. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism // *Mucosal Immunology*. — 2010. — 3(5). — 450–460. doi: 10.1038/mi.2010.20
 60. Escalante, N. K., Lemire, P., Cruz Tleugabulova, M., Prescott, D., Mortha, A., Streutker, C. J., Girardin, S. E., Philpott, D. J., & Mallewaey, T. The common mouse protozoa *Tritrichomonas muris* alters mucosal T cell homeostasis and colitis susceptibility // *Journal of*

- Experimental Medicine. — 2016. — 213(13). — 2841–2850. doi: 10.1084/jem.20161776
61. Evans, G. O. (Ed.). *Animal Clinical Chemistry: A Practical Handbook for Toxicologists and Biomedical Researchers // Animal Clinical Chemistry: A Practical Handbook for Toxicologists and Biomedical Researchers/* — CRC Press. — 2009. — P: 47–49.
 62. Faix, J. D. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences Biomarkers of sepsis Biomarkers of sepsis // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* — 2013. — 50(501). — 23–36. doi: 10.3109/10408363.2013.764490
 63. Feng, Q., Chen, W.-D., & Wang, Y.-D. *Gut Microbiota: An Integral Moderator in Health and Disease // Frontiers in Microbiology.* — 2018. — 9. — 151. doi: 10.3389/fmicb.2018.00151
 64. Festen, E. A. M., Goyette, P., Scott, R., Annese, V., Zhernakova, A., Lian, J., Lefebvre, C., Brant, S. R., Cho, J. H., Silverberg, M. S., Taylor, K. D., de Jong, D. J., Stokkers, P. C., McGovern, D., Palmieri, O., Achkar, J.-P., Xavier, R. J., Daly, M. J., Duerr, R. H., ... Rioux, J. D. *Genetic variants in the region harbouring IL2/IL21 associated with ulcerative colitis // Gut.* — 2009. — 58(6). — 799–804. doi: 10.1136/gut.2008.166918
 65. Foltz, C. J., Fox, J. G., Cahill, R., Murphy, J. C., Yan, L., Shames, B., & Schauer, D. B. *Spontaneous inflammatory bowel disease in multiple mutant mouse lines: Association with colonization by Helicobacter hepaticus // Helicobacter.* — 1998. — 3(2). — 69–78. doi: 10.1046/j.1523-5378.1998.08006.x
 66. Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., Quertinmont, E., Abramowicz, M., Van Gossum, A., Devière, J., & Rutgeerts, P. *Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis // Gut.* — 2004. — 53(7). — 987–992. doi: 10.1136/gut.2003.030205
 67. Frank, D. N., St. Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases // Proceedings of the National Academy of Sciences.* — 2007. — 104(34). — 13780–13785. doi: 10.1073/pnas.0706625104
 68. Franke, A., Balschun, T., Karlsen, T. H., Hedderich, J., May, S., Lu, T., Schuldt, D., Nikolaus, S., Rosenstiel, P., Krawczak, M., & Schreiber, S. *Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis // Nature Genetics.* — 2008. — 40(6). — 713–715. doi: 10.1038/ng.148
 69. Fries, W., Renda, M. C., Lo Presti, M. A., Raso, A., Orlando, A., Oliva, L., Giofre, M. R., Maggio, A., Mattaliano, A., Macaluso, A., & Cottone, M. *Intestinal Permeability and Genetic Determinants in Patients, First-Degree Relatives, and Controls in a High-Incidence Area of Crohn's Disease in Southern Italy // The American Journal of Gastroenterology.* — 2005. —

- 100(12). — 2730–2736. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.00325.x
70. Fu, J., Wei, B., Wen, T., Johansson, M. E. V., Liu, X., Bradford, E., Thomsson, K. a, Mcgee, S., Mansour, L., Tong, M., Mcdaniel, J. M., Sferra, T. J., Turner, J., Chen, H., Hansson, G. C., Braun, J., & Xia, L. Loss of intestinal core 1–derived // *The Journal of Clinical Investigation*. — 2011. — 121(4). — 1657–1666. doi: 10.1172/JCI45538.is
71. Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., & Fujiyama, Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease // *Gut*. — 2003. — 52(1). — 65–70. doi: 10.1136/gut.52.1.65
72. Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., & Ohno, H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate // *Nature*. — 2011. — 469(7331). — 543–547. doi: 10.1038/nature09646
73. Fukuda, S., Toh, H., Taylor, T. D., Ohno, H., & Hattori, M. Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters // *Gut Microbe*. — 2012. — 3(5). — 449–454. doi: 10.4161/gmic.21214
74. Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., ... Ohno, H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells // *Nature*. — 2013. — 504(7480). — 446–450. doi: 10.1038/nature12721
75. Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D., & Cerf-Bensussan, N. The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses // *Immunity*. — 2009. — 31(4). — 677–689. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.020
76. Gassler, N., Rohr, C., Schneider, A., Kartenbeck, J., Bach, A., Obermüller, N., Otto, H. F., & Autschbach, F. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. — 2001. — 281(1). — G216–G228. doi: 10.1152/ajpgi.2001.281.1.G216
77. Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., & Blumberg, R. S. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system // *Science*. — 2016. — 352(6285). — 539–544. doi: 10.1126/science.aad9378
78. Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C. V., Fleming, M. P. P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N. J., Travis, S. P. L., & Powrie, F. IL-23–responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease // *The Journal of Experimental Medicine* 2011. — 208(6). —

- 1127–1133. doi: 10.1084/jem.20101712
79. Gersemann, M., Becker, S., Kübler, I., Koslowski, M., Wang, G., Herrlinger, K. R., Griger, J., Fritz, P., Fellermann, K., Schwab, M., Wehkamp, J., & Stange, E. F. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis // *Differentiation*. — 2009. — 77(1). — 84–94. doi: 10.1016/j.diff.2008.09.008
 80. Geuking, M. B., Cahenzli, J., Lawson, M. A. E., Ng, D. C. K., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses // *Immunity*. — 2011. — 34(5). — 794–806. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.021
 81. Gibson, G. R., McCartney, A. L., & Rastall, R. A. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections // *British Journal of Nutrition*. — 2005. — 93(S1). — S31–S34. doi: 10.1079/bjn20041343
 82. Gomollón, F., Dignass, A., Annese, V., Tilg, H., Van Assche, G., Lindsay, J. O., Peyrin-Biroulet, L., Cullen, G. J., Daperno, M., Kucharzik, T., Rieder, F., Almer, S., Armuzzi, A., Harbord, M., Langhorst, J., Sans, M., Chowers, Y., Fiorino, G., Juillerat, P., ... ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management // *Journal of Crohn's & Colitis*. — 2017. — 11(1). — 3–25. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw168
 83. Gradel, K. O., Nielsen, H. L., Schönheyder, H. C., Ejlersen, T., Kristensen, B., & Nielsen, H. Increased Short- and Long-Term Risk of Inflammatory Bowel Disease After Salmonella or Campylobacter Gastroenteritis // *Gastroenterology*. — 2009. — 137(2). — 495–501. doi: 10.1053/j.gastro.2009.04.001
 84. Grigg, J. B., & Sonnenberg, G. F. Host-Microbiota Interactions Shape Local and Systemic Inflammatory Diseases // *The Journal of Immunology*. — 2017. — 198(2). — 564–571. doi: 10.4049/jimmunol.1601621
 85. Hafer, A., Krämer, S., Duncker, S., Krüger, M., Manns, M. P., & Bischoff, S. C. Effect of oral lactulose on clinical and immunohistochemical parameters in patients with inflammatory bowel disease: a pilot study // *BMC Gastroenterology*. — 2007. — 7. — 36. doi: 10.1186/1471-230X-7-36
 86. Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F. J., & Brummer, R.-J. Review article: the role of butyrate on colonic function // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. — 2007. — 27(2). — 104–119. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x
 87. Hanai, H., Takeuchi, K., Iida, T., Kashiwagi, N., Saniabadi, A. R., Matsushita, I., Sato, Y., Kasuga, N., & Nakamura, T. Relationship between fecal calprotectin, intestinal inflammation, and peripheral blood neutrophils in patients with active ulcerative colitis // *Digestive Diseases*

- and Sciences. — 2004. — 49(9). — 1438–1443.
88. Hanski, C., Born, M., Foss, H. D., Marowski, B., Mansmann, U., Arastéh, K., Bachler, B., Papenfuss, M., & Niedobitek, F. Defective post-transcriptional processing of MUC2 mucin in ulcerative colitis and in Crohn's disease increases detectability of the MUC2 protein core. *The Journal of Pathology*. — 1999. — 188(3). — 304–311. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199907)188:3<304::AID-PATH375>3.0.CO;2-A
 89. Harmsen, H. J. M., Pouwels, S. D., Funke, A., Bos, N. A., & Dijkstra, G. Crohn's Disease Patients Have More IgG-Binding Fecal Bacteria than Controls // *Clinical and Vaccine Immunology*. — 2012. — 19(4). — 515-521. doi: 10.1128/CVI.05517-11
 90. Hart, A. L., Al-Hassi, H. O., Rigby, R. J., Bell, S. J., Emmanuel, A. V., Knight, S. C., Kamm, M. A., & Stagg, A. J. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases // *Gastroenterology*. — 2005. — 129(1). — 50–65.
 91. Hasan, N., & Yang, H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation // *PeerJ*. — 2019. — 7(8). — e7502. doi: 10.7717/PEERJ.7502
 92. He, R., Li, Y., Han, C., Lin, R., Qian, W., & Hou, X. L-Fucose ameliorates DSS-induced acute colitis via inhibiting macrophage M1 polarization and inhibiting NLRP3 inflammasome and NF-kB activation // *International Immunopharmacology*. — 2019. — 73. — 379–388. doi: 10.1016/j.intimp.2019.05.013
 93. Hendrickson, B. A., Gokhale, R., & Cho, J. H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease // *Clinical Microbiology Reviews*. — 2002. — 15(1). — 79–94. doi: 10.1128/cmr.15.1.79-94.2002
 94. Holzheimer, R. G. Antibiotic Induced Endotoxin Release and Clinical Sepsis: a Review // *Journal of Chemotherapy*. — 2001. — 13(sup4). — 159–172. doi: 10.1179/joc.2001.13.Supplement-2.159
 95. Houghteling, P. D., & Walker, W. A. Why Is Initial Bacterial Colonization of the Intestine Important to Infants' and Children's Health? // *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. — 2015. — 60(3). — 294–307. doi: 10.1097/MPG.0000000000000597
 96. Howitt, M. R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A. M., Tran, S. V., Weinstock, J. V., Gallini, C. A., Redding, K., Margolskee, R. F., Osborne, L. C., Artis, D., & Garrett, W. S. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut // *Science*. — 2016. — 351(6279). — 1329–1333. doi: 10.1126/science.aaf1648
 97. Hu, S., Wang, J., Xu, Y., Yang, H., Wang, J., Xue, C., Yan, X., & Su, L. Anti-inflammation effects of fucosylated chondroitin sulphate from: *Acaudina molpadioides* by altering gut microbiota in obese mice // *Food and Function*. — 2019. — 10(3). — 1736–1746. doi: 10.1039/c8fo02364f

98. Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.-P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.-F., Sahbatou, M., & Thomas, G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease // *Nature*. — 2001. — 411(6837). — 599–603. doi: 10.1038/35079107
99. Huijsdens, X. W., Linskens, R. K., Koppes, J., Tang, Y. L., Meuwissen, S. G. M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Savelkoul, P. H. M. Detection of Helicobacter species DNA by quantitative PCR in the gastrointestinal tract of healthy individuals and of patients with inflammatory bowel disease // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. — 2004. — 41(1). — 79–84. doi: 10.1016/j.femsim.2004.01.007
100. Hviid, A., Svanstrom, H., & Frisch, M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood // *Gut*. — 2011. — 60(1). — 49–54. doi: 10.1136/gut.2010.219683
101. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., & Littman, D. R. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria // *Cell*. — 2009. — 139(3). — 485–498. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033
102. Jakobsson, H. E., Rodriguez-Pineiro, A. M., Schutte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., Sommer, F., Backhed, F., Hansson, G. C., & Johansson, M. E. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier // *EMBO Reports*. — 2015. — 16(2). — 164–177. doi: 10.15252/embr.201439263
103. Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G. C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2008. — 105(39). — 15064–15069. doi: 10.1073/pnas.0803124105
104. Johansson, Malin E V, Gustafsson, J. K., Holmén-Larsson, J., Jabbar, K. S., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F. K., Carvalho, F. A., Gewirtz, A. T., Sjövall, H., & Hansson, G. C. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis // *Gut*. — 2014. — 63(2). — 281–291. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303207
105. Johansson, Malin E V, Larsson, J. M. H., & Hansson, G. C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2011. — 108(Supplement_1). — 4659–4665. doi: 10.1073/pnas.1006451107
106. Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P., & Vermeire, S. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their

- unaffected relatives // *Gut*. — 2011. — 60(5). — 631–637. doi: 10.1136/gut.2010.223263
107. Josefsdottir, K. S., Baldridge, M. T., Kadmon, C. S., & King, K. Y. Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota // *Blood*. — 2017. — 129(6). — 729–739. doi: 10.1182/blood-2016-03-708594
108. Kaakoush, N. O., Holmes, J., Octavia, S., Man, S. M., Zhang, L., Castaño-Rodríguez, N., Day, A. S., Leach, S. T., Lemberg, D. A., Dutt, S., Stormon, M., O’Loughlin, E. V., Magoffin, A., & Mitchell, H. Detection of Helicobacteraceae in Intestinal Biopsies of Children with Crohn’s Disease // *Helicobacter*. — 2010. — 15(6). — 549–557. doi: 10.1111/j.1523-5378.2010.00792.x
109. Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y., & Núñez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease // *Nature Reviews Immunology*. — 2013. — 13(5). — 321–335. doi: 10.1038/nri3430
110. Kanauchi, O., Suga, T., Tochiara, M., Hibi, T., Naganuma, M., Homma, T., Asakura, H., Nakano, H., Takahama, K., Fujiyama, Y., Andoh, A., Shimoyama, T., Hida, N., Haruma, K., Koga, H., Mitsuyama, K., Sata, M., Fukuda, M., Kojima, A., & Bamba, T. Treatment of ulcerative colitis by feeding with germinated barley foodstuff: first report of a multicenter open control trial // *Journal of Gastroenterology*. — 2002. — 37(Suppl 14). — 67–72.
111. Kashyap, P. C., Marcobal, A., Ursell, L. K., Smits, S. A., Sonnenburg, E. D., Costello, E. K., Higginbottom, S. K., Domino, S. E., Holmes, S. P., Relman, D. A., Knight, R., Gordon, J. I., & Sonnenburg, J. L. Genetically dictated change in host mucus carbohydrate landscape exerts a diet-dependent effect on the gut microbiota // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2013. — 110(42). — 17059–17064. doi: 10.1073/pnas.1306070110
112. Kato, K., Mizuno, S., Umesaki, Y., Ishii, Y., Sugitani, M., Imaoka, A., Otsuka, M., Hasunuma, O., Kurihara, R., Iwasaki, A., & Arakawa, Y. Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2004. — 20(10). — 1133–1141. doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.02268.x
113. Ke, J., Li, Y., Han, C., He, R., Lin, R., Qian, W., & Hou, X. Fucose Ameliorate Intestinal Inflammation Through Modulating the Crosstalk Between Bile Acids and Gut Microbiota in a Chronic Colitis Murine Model // *Inflammatory Bowel Diseases*. — 2020. — 26(6). — 863–873. doi: 10.1093/ibd/izaa007
114. Kelly, C. J., Zheng, L., Campbell, E. L., Saeedi, B., Scholz, C. C., Bayless, A. J., Wilson, K. E., Glover, L. E., Kominsky, D. J., Magnuson, A., Weir, T. L., Ehrentaut, S. F., Pickel, C., Kuhn, K. A., Lanis, J. M., Nguyen, V., Taylor, C. T., & Colgan, S. P. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue

- Barrier Function // *Cell Host & Microbe*. — 2015. — 17(5). — 662–671. doi: 10.1016/j.chom.2015.03.005
115. Kim, Y. S., & Ho, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress // *Current Gastroenterology Reports*. — 2010. — 12(5). — 319–330. doi: 10.1007/s11894-010-0131-2
116. Kinnebrew, M. A., Ubeda, C., Zenewicz, L. A., Smith, N., Flavell, R. A., & Pamer, E. G. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2010. — 201(4). — 534–543. doi: 10.1086/650203
117. Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., Kitazume, M. T., Nakazawa, A., Sugita, A., Koganei, K., Isobe, K., & Hibi, T. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease // *Gut*. — 2008. — 57(12). — 1682–1689. doi: 10.1136/gut.2007.135053
118. Kohl, K. D., & Denise Dearing, M. The woodrat gut microbiota as an experimental system for understanding microbial metabolism of dietary toxins // *Frontiers in Microbiology*. — 2016. — 7. — 1165. doi: 10.3389/fmicb.2016.01165
119. König, J., Wells, J., Cani, P. D., García-Ródenas, C. L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F., & Brummer, R.-J. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease // *Clinical and Translational Gastroenterology*. — 2016. — 7(10). — e196. doi: 10.1038/CTG.2016.54
120. Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., & Martens, E. C. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota // *Nature Reviews Microbiology*. — 2012. — 10(5). — 323–335. doi: 10.1038/nrmicro2746
121. Kronman, M. P., Zaoutis, T. E., Haynes, K., Feng, R., & Coffin, S. E. Antibiotic exposure and IBD development among children: a population-based cohort study // *Pediatrics*. — 2012. — 130(4). — e794-803. doi: 10.1542/peds.2011-3886
122. Kullberg, M. C., Jankovic, D., Gorelick, P. L., Caspar, P., Letterio, J. J., Cheever, A. W., & Sher, A. Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis // *The Journal of Experimental Medicine*. — 2002. — 196(4). — 505–515. doi: 10.1084/jem.20020556
123. Kullberg, M. C., Ward, J. M., Gorelick, P. L., Caspar, P., Hieny, S., Cheever, A., Jankovic, D., & Sher, A. *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12-and gamma interferon- dependent mechanism // *Infection and Immunity*. — 1998. — 66(11). — 5157–5166. doi: 10.1128/iai.66.11.5157-5166.1998

124. Kumar, M., Kissoon-Singh, V., Coria, A. L., Moreau, F., & Chadee, K. Probiotic mixture VSL#3 reduces colonic inflammation and improves intestinal barrier function in muc2 mucin-deficient mice // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. — 2017. — 312(1). — G34–G45. doi: 10.1152/ajpgi.00298.2016
125. Lane, E. R., Zisman, T., & Suskind, D. The microbiota in inflammatory bowel disease: current and therapeutic insights // *Journal of Inflammation Research*. — 2017. — 10. — 63–73. doi: 10.2147/JIR.S116088
126. Larsson, Jessica M. Holmn, Karlsson, H., Crespo, J. G., Johansson, M. E. V., Eklund, L., Sjövall, H., & Hansson, G. C. Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation // *Inflammatory Bowel Diseases*. — 2011. — 17(11). — 2299–2307. doi: 10.1002/ibd.21625
127. Larsson, Jessica M. Holmén, Thomsson, K. A., Rodríguez-Piñero, A. M., Karlsson, H., & Hansson, G. C. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. III. Gastrointestinal Muc5ac and Muc2 mucin O-glycan patterns reveal a regiospecific distribution // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. — 2013. — 305(5). — G357. doi: 10.1152/ajpgi.00048.2013
128. Lean, Q. Y., Eri, R. D., Fitton, J. H., Patel, R. P., & Gueven, N. Fucoidan Extracts Ameliorate Acute Colitis // *PLOS* . — 2015. — 10(6). — e0128453. doi: 10.1371/journal.pone.0128453
129. Ledder, O. Antibiotics in inflammatory bowel diseases: Do we know what we're doing? // *Translational Pediatrics*. — 2019. — 8(1). — 42–55. doi: 10.21037/tp.2018.11.02
130. Ledder, O., & Turner, D. Antibiotics in IBD: Still a Role in the Biological Era? // *Inflammatory Bowel Diseases*. — 2018. — 24(9). — 1676–1688. doi: 10.1093/ibd/izy067
131. Lee, R. T., Hsu, T. L., Huang, S. K., Hsieh, S. L., Wong, C. H., & Lee, Y. C. Survey of immune-related, mannose/fucose-binding C-type lectin receptors reveals widely divergent sugar-binding specificities // *Glycobiology*. — 2011. — 21(4). — 512–520. doi: 10.1093/glycob/cwq193
132. Lee, S.-H., Ko, C.-I., Jee, Y., Jeong, Y., Kim, M., Kim, J.-S., & Jeon, Y.-J. Anti-inflammatory effect of fucoidan extracted from *Ecklonia cava* in zebrafish model // *Carbohydrate Polymers*. — 2013. — 92(1). — 84–89. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.09.066
133. Lee, Seung Hoon, Kwon, J. eun, & Cho, M.-L. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease // *Intestinal Research*. — 2018. — 16(1). — 26. doi: 10.5217/ir.2018.16.1.26
134. Lee, Sung Hee. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases // *Intestinal Research*. — 2015. — 13(1). — 11. doi: 10.5217/ir.2015.13.1.11
135. Lepage, P., Häslér, R., Spehlmann, M. E., Rehman, A., Zvirbliene, A., Begun, A., Ott, S.,

- Kupcinskas, L., Doré, J., Raedler, A., & Schreiber, S. Twin Study Indicates Loss of Interaction Between Microbiota and Mucosa of Patients With Ulcerative Colitis // *Gastroenterology*. — 2011. — 141(1). — 227–236. doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.011
136. Li, W. Q., Cho, E., Khalili, H., Wu, S., Chan, A. T., & Qureshi, A. A. Rosacea, Use of Tetracycline, and Risk of Incident Inflammatory Bowel Disease in Women // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. — 2016. — 14(2). — 220-225.e3. doi: 10.1016/j.cgh.2015.09.013
137. Licht, T. R., Ebersbach, T., & Frøkiær, H. Prebiotics for prevention of gut infections // *Trends in Food Science and Technology*. — 2012. — 23(2). — 70–82. doi: 10.1016/j.tifs.2011.08.011
138. Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: Mucins, antimicrobial peptides, and Microbiota // *Clinical Microbiology Reviews*. — 2006. — 19(2). — 315–337. doi: 10.1128/CMR.19.2.315-337.2006
139. Lin, R., Chen, H., Shu, W., Sun, M., Fang, L., Shi, Y., Pang, Z., Wu, W., & Liu, Z. Clinical significance of soluble immunoglobulins A and G and their coated bacteria in feces of patients with inflammatory bowel disease // *Journal of Translational Medicine*. — 2018. — 16. — 359. doi: 10.1186/s12967-018-1723-0
140. Litvinova, E. A., Bets, V. D., Feofanova, N. A., Gvozdeva, O. V., Achasova, K. M., Alperina, E. L., & Kozhevnikova, E. N. Dietary fucose affects macrophage polarization and reproductive performance in mice // *Nutrients*. — 2021. — 13(3). — 855. doi: 10.3390/nu13030855
141. 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
142. Liu, M., Ma, L., Chen, Q., Zhang, P., Chen, C., Jia, L., & Li, H. Fucoidan alleviates dyslipidemia and modulates gut microbiota in high-fat diet-induced mice // *Journal of Functional Foods*. — 2018. — 48. — 220–227. doi: 10.1016/J.JFF.2018.07.006
143. Lord, J. D., Valliant-Saunders, K., Hahn, H., Thirlby, R. C., & Ziegler, S. F. Paradoxically Increased FOXP3⁺ T Cells in IBD Do Not Preferentially Express the Isoform of FOXP3 Lacking Exon 2 // *Digestive Diseases and Sciences*. — 2012. — 57(11). — 2846–2855. doi: 10.1007/s10620-012-2292-3
144. Love, D., Fajt, V. R., Hairgrove, T., Jones, M., & Thompson, J. A. Metronidazole for the treatment of *Tritrichomonas foetus* in bulls // *BMC Veterinary Research*. — 2017. — 13(1). — 107. doi: 10.1186/s12917-017-0999-2
145. Lundgren, A., Strömberg, E., Sjöling, A., Lindholm, C., Enarsson, K., Edebo, A., Johnsson, E., Suri-Payer, E., Larsson, P., Rudin, A., Svennerholm, A.-M., & Lundin, B. S. Mucosal

- FOXP3-expressing CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients // *Infection and Immunity*. — 2005. — 73(1). — 523–531. doi: 10.1128/IAI.73.1.523-531.2005
146. Lynch, S. V., & Pedersen, O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease // *The New England Journal of Medicine*. — 2016. — 375(24). — 2369-2379. doi: 10.1056/NEJMRA1600266
147. Mähler, M., Berar, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., Pritchett-Corning, K., & Raspa, M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units // *Laboratory Animals*. — 2014. — 48(3). — 178–192. doi: 10.1177/0023677213516312
148. Man, S. M., Zhang, L., Day, A. S., Leach, S., & Mitchell, H. Detection of enterohepatic and gastric *Helicobacter* species in fecal specimens of children with crohn's disease // *Helicobacter*. — 2008. — 13(4). — 234–238. doi: 10.1111/j.1523-5378.2008.00607.x
149. Matsuoka, K., Inoue, N., Sato, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kishi, Y., Sakuraba, A., Hitotsumatsu, O., Ogata, H., Koganei, K., Fukushima, T., Kanai, T., Watanabe, M., Ishii, H., & Hibi, T. T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease // *Gut*. — 2004. — 53(9). — 1303–1308. doi: 10.1136/gut.2003.024190
150. Matsuoka, Katsuyoshi, & Kanai, T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease // *Seminars in Immunopathology*. — 2015. — 37(1). — 47–55. doi:10.1007/s00281-014-0454-4
151. Maul, J., Loddenkemper, C., Mundt, P., Berg, E., Giese, T., Stallmach, A., Zeitz, M., & Duchmann, R. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25^(high) T cells in inflammatory bowel disease // *Gastroenterology*. — 2005. — 128(7). — 1868–1878.
152. Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system // *Nature*. — 2012. — 489(7415). — 231–241. doi: 10.1038/nature11551
153. Mazmanian, S. K., Round, J. L., & Kasper, D. L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease // *Nature*. — 2008. — 453(7195). — 620–625. doi: 10.1038/nature07008
154. McCarthy, D. A., Rampton, D. S., & Liu, Y.-C. Peripheral blood neutrophils in inflammatory bowel disease: morphological evidence of in vivo activation in active disease // *Clinical & Experimental Immunology*. — 1991. — 86(3). — 489–493. doi: 10.1111/j.1365-2249.1991.tb02958.x
155. McCole, D. F. IBD Candidate Genes and Intestinal Barrier Regulation // *Inflammatory Bowel*

- Diseases 2014. — 20(10). — 1829–1849. doi: 10.1097/MIB.000000000000090
156. McGovern, D. P. B., Jones, M. R., Taylor, K. D., Marciante, K., Yan, X., Dubinsky, M., Ippoliti, A., Vasiliauskas, E., Berel, D., Derkowski, C., Dutridge, D., Fleshner, P., Shih, D. Q., Melmed, G., Mengesha, E., King, L., Pressman, S., Haritunians, T., Guo, X., ... International IBD Genetics Consortium. Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease // *Human Molecular Genetics*. — 2010. — 19(17). — 3468–3476. doi: 10.1093/hmg/ddq248
157. Mirsepassi-Lauridsen, H. C., Vallance, B. A., Krogfelt, K. A., & Petersen, A. M. *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease // *Clinical Microbiology Reviews*. — 2019. — 32(2). — e00060-18. doi: 10.1128/CMR.00060-18
158. Mizoguchi, A., Takeuchi, T., Himuro, H., Okada, T., & Mizoguchi, E. Genetically engineered mouse models for studying inflammatory bowel disease // *The Journal of Pathology*. — 2016. — 238(2). — 205–219. doi: 10.1002/path.4640
159. Moehle, C., Ackermann, N., Langmann, T., Aslanidis, C., Kel, A., Kel-Margoulis, O., Schmitz-Madry, A., Zahn, A., Stremmel, W., & Schmitz, G. Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease // *Journal of Molecular Medicine*. — 2006, 84(12). — 1055–1066. doi: 10.1007/s00109-006-0100-2
160. Monceaux, C. P., Testerman, T. L., Boktor, M., Jordan, P., Adegboyega, P., McGee, D. J., Jennings, M. H., Parker, C. P., Gupta, S., Yi, P., Ganta, V. C., Galous, H., Manas, K., & Alexander, J. S. Helicobacter infection decreases basal colon inflammation, but increases disease activity in experimental IBD // *Open Journal of Gastroenterology*. — 2013. — 03(03). — 177–189. doi: 10.4236/ojgas.2013.33029
161. Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., Reyes, J. A., Shah, S. A., LeLeiko, N., Snapper, S. B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B. E., Xavier, R. J., & Huttenhower, C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment // *Genome Biology*. — 2012. — 13(9). — R79. doi: 10.1186/gb-2012-13-9-r79
162. Mottet, C., Uhlig, H. H., & Powrie, F. Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells // *The Journal of Immunology*. — 2003.— 170(8).— 3939–3943. doi: 10.4049/jimmunol.170.8.3939
163. Neurath, M. F., Weigmann, B., Finotto, S., Glickman, J., Nieuwenhuis, E., Iijima, H., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Mudter, J., Galle, P. R., Bhan, A., Autschbach, F., Sullivan, B. M., Szabo, S. J., Glimcher, L. H., & Blumberg, R. S. The Transcription Factor T-bet Regulates Mucosal T Cell Activation in Experimental Colitis and Crohn's Disease. — *The Journal of Experimental Medicine*. — 2002. — 195(9). — 1129–1143. doi: 10.1084/jem.20011956

164. Ng, K. M., Ferreyra, J. A., Higginbottom, S. K., Lynch, J. B., Kashyap, P. C., Gopinath, S., Naidu, N., Choudhury, B., Weimer, B. C., Monack, D. M., & Sonnenburg, J. L. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens // *Nature*. — 2013. — 502(7469). — 96–99. doi: 10.1038/nature12503
165. Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Kaplan, G. G. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies // *The Lancet*. — 2017. — 390(10114). — 2769–2778. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0
166. Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., & Andoh, A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease // *Clinical Journal of Gastroenterology*. — 2018. — 11(1). — 1–10. doi: 10.1007/s12328-017-0813-5
167. Nitzan, O., Elias, M., Peretz, A., & Saliba, W. Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease // *World Journal of Gastroenterology*. — 2016. — 22(3). — 1078–1087. doi: 10.3748/wjg.v22.i3.1078
168. Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J.-P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nuñez, G., & Cho, J. H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease // *Nature*. — 2001. — 411(6837). — 603–606. doi: 10.1038/35079114
169. Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., German Grehov, O. G., Kandrov, D., Rasputin, K., Syabro, M., & Tleukenov, T. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. — 2012. — 28(8). — 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091
170. Okumura, C. Y. M., Baum, L. G., & Johnson, P. J. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis* // *Cellular Microbiology*. — 2008. — 10(10). — 2078–2090. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01190.x
171. Orel, R., & Kamhi Trop, T. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease // *World Journal of Gastroenterology*. — 2014. — 20(33). — 11505. doi: 10.3748/wjg.v20.i33.11505
172. Östman, S., Rask, C., Wold, A. E., Hultkrantz, S., & Telemo, E. Impaired regulatory T cell function in germ-free mice // *European Journal of Immunology*. — 2006. — 36(9). — 2336–2346. doi: 10.1002/eji.200535244
173. Pacheco, A. R., Curtis, M. M., Ritchie, J. M., Munera, D., Waldor, M. K., Moreira, C. G., & Sperandio, V. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization // *Nature*. — 2012. —

- 492(7427). — 113–117. doi: 10.1038/nature11623
174. Partida-Rodríguez, O., Serrano-Vázquez, A., Nieves-Ramírez, M. E., Moran, P., Rojas, L., Portillo, T., González, E., Hernández, E., Finlay, B. B., & Ximenez, C. Human Intestinal Microbiota: Interaction Between Parasites and the Host Immune Response // *Archives of Medical Research*. — 2017. — 48(8). — 690–700. doi: 10.1016/j.arcmed.2017.11.015
175. Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M. H., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Nyström, E. E. L., Wising, C., Johansson, M. E. V., & Hansson, G. C. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system // *Immunological Reviews*. — 2014. — 260(1). — 8–20. doi: 10.1111/imr.12182
176. Peterson, D. A., McNulty, N. P., Guruge, J. L., & Gordon, J. I. IgA Response to Symbiotic Bacteria as a Mediator of Gut Homeostasis // *Cell Host & Microbe*. — 2007. — 2(5). — 328–339. doi: 10.1016/j.chom.2007.09.013
177. Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, G. C., Gendler, S. J., Velcich, A., Lundberg, J. O., Roos, S., Holm, L., & Phillipson, M. Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. — 2011. — 300(2). — G327–G333. doi: 10.1152/ajpgi.00422.2010
178. Pham, T. A. N., Clare, S., Goulding, D., Arasteh, J. M., Stares, M. D., Browne, H. P., Keane, J. A., Page, A. J., Kumasaka, N., Kane, L., Mottram, L., Harcourt, K., Hale, C., Arends, M. J., Gaffney, D. J., Project, T. S. M. G., Dougan, G., & Lawley, T. D. Epithelial IL-22RA1-Mediated Fucosylation Promotes Intestinal Colonization Resistance to an Opportunistic Pathogen // *Cell Host & Microbe*. — 2014. — 16(4). — 504. doi: 10.1016/J.CHOM.2014.08.017
179. Pickard, J. M., & Chervonsky, A. V. Intestinal fucose as a mediator of host-microbe symbiosis // *Journal of Immunology*. — 2015. — 194(12). — 5588–5593. doi: 10.4049/jimmunol.1500395
180. Pickard, J. M., Maurice, C. F., Kinnebrew, M. A., Abt, M. C., Schenten, D., Golovkina, T. V., Bogatyrev, S. R., Ismagilov, R. F., Pamer, E. G., Turnbaugh, P. J., & Chervonsky, A. V. Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host–commensal symbiosis in sickness // *Nature*. — 2014. — 514(7524). — 638–641. doi: 10.1038/nature13823
181. Pickard, J., Zeng, M., Caruso, R., & Núñez, G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease // *Immunological Reviews*. — 2017. — 279(1). — 70–89. doi: 10.1111/IMR.12567
182. Pierik, M., Joossens, S., Van Steen, K., Van Schuerbeek, N., Vlietinck, R., Rutgeerts, P., &

- Vermeire, S. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases // *Inflammatory Bowel Diseases*. — 2006. — 12(1). — 1–8. doi: 10.1097/01.mib.0000195389.11645.ab
183. Png, C. W., Lindén, S. K., Gilshenan, K. S., Zoetendal, E. G., McSweeney, C. S., Sly, L. I., McGuckin, M. A., & Florin, T. H. J. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria // *American Journal of Gastroenterology*. — 2010. — 105(11). — 2420–2428. doi: 10.1038/ajg.2010.281
184. Poussier, P., Ning, T., Chen, J., Banerjee, D., & Julius, M. Intestinal inflammation observed in IL-2R/IL-2 mutant mice is associated with impaired intestinal T lymphopoiesis // *Gastroenterology*. — 2000. — 118(5). — 880–891.
185. Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddie, L. B., & Coffman, R. L. Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice // *International Immunology*. — 1993. — 5(11). — 1461–1471. doi: 10.1093/intimm/5.11.1461
186. Pullan, R. D., Thomas, G. A. O., Rhodes, M., Newcombe, R. G., Williams, G. T., Allen, A., & Rhodes, J. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis // *Gut*. — 1994. — 35(3). — 353–359. doi: 10.1136/gut.35.3.353
187. Qiao, Y. Q., Cai, C. W., & Ran, Z. H. Therapeutic modulation of gut microbiota in inflammatory bowel disease: More questions to be answered // *Journal of Digestive Diseases*. — 2016. — 17(12). — 800–810. doi: 10.1111/1751-2980.12422
188. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis // *Cell*. — 2004. — 118(2). — 229–241. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.002
189. Randhawa, P. K., Singh, K., Singh, N., & Jaggi, A. S. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents // *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. — 2014. — 18(4). — 279–288. doi: 10.4196/kjpp.2014.18.4.279
190. Rausch, P., Rehman, A., Kunzel, S., Hasler, R., Ott, S. J., Schreiber, S., Rosenstiel, P., Franke, A., & Baines, J. F. Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2011. — 108(47). — 19030–19035. doi: 10.1073/pnas.1106408108
191. Rennick, D. M., Fort, M. M., & Davidson, N. J. Studies with IL-10^{-/-} mice: an overview // *Journal of Leukocyte Biology*. — 1997. — 61(4). — 389–396. doi: 10.1002/jlb.61.4.389
192. Robbe, C., Capon, C., Coddeville, B., & Michalski, J. C. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract // *Biochemical Journal*. — 2004. — 384(2). — 307–316. doi: 10.1042/BJ20040605

193. Round, J. L., & Mazmanian, S. K. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2010. — 107(27). — 12204–12209. doi: 10.1073/pnas.0909122107
194. Vaishnav, S., Yamamoto, M., Severson, K. M., Ruhn, K. A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E. K., Hooper, L. The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine // *Science*. — 2011. — 334(6053). — 255–258. doi: 10.1126/SCIENCE.1209791
195. Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic // *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. — 2019. — 16(10). — 605-616. doi: 10.1038/s41575-019-0173-3
196. Sartor, R. B. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn’s disease and ulcerative colitis // *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*. — 2006. — 3(7). — 390–407. doi: 10.1038/ncpgasthep0528
197. Schneider, K. M., Mohs, A., Kilic, K., Candels, L. S., Elfers, C., Bennek, E., Ben Schneider, L., Heymann, F., Gassler, N., Penders, J., & Trautwein, C. Intestinal microbiota protects against MCD diet-induced steatohepatitis // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — 20(2). — 308. doi: 10.3390/ijms20020308
198. Schwieger, F., & Tebbe, C. C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1998. — 64(12). — 4870–4876.
199. Scott, C. L., Aumeunier, A. M., & Mowat, A. M. Intestinal CD103⁺ dendritic cells: master regulators of tolerance? // *Trends in Immunology*. — 2011. — 32(9). — 412–419. doi: 10.1016/j.it.2011.06.003
200. Scott, K. G. E., Meddings, J. B., Kirk, D. R., Lees-Miller, S. P., & Buret, A. G. Intestinal infection with *Giardia* spp. Reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion // *Gastroenterology*. — 2002. — 123(4). — 1179–1190. doi: 10.1053/gast.2002.36002
201. Shaia, C. I., Voyich, J., Gillis, S. J., Singh, B. N., & Burgess, D. E. Purification and expression of the Tf190 adhesin in *Tritrichomonas foetus* // *Infection and Immunity*. — 1998. — 66(3). — 1100–1105.
202. Shang, Q., Shan, X., Cai, C., Hao, J., Li, G., & Yu, G. Dietary fucoidan modulates the gut microbiota in mice by increasing the abundance of *Lactobacillus* and *Ruminococcaceae* // *Food & Function*. — 2016. — 7(7). — 3224–3232. doi: 10.1039/c6fo00309e
203. Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A.,

- Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease // *Journal of Cellular Physiology*. — 2018. — 233(9). — 6425–6440. doi: 10.1002/jcp.26429
204. Shaw, S. Y., Blanchard, J. F., & Bernstein, C. N. Association Between the Use of Antibiotics in the First Year of Life and Pediatric Inflammatory Bowel Disease // *American Journal of Gastroenterology*. — 2010. — 105(12). — 2687–2692. doi: 10.1038/ajg.2010.398
205. Shaw, S. Y., Blanchard, J. F., & Bernstein, C. N. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis // *American Journal of Gastroenterology*. — 2011. — 106(12). — 2133–2142. doi: 10.1038/ajg.2011.304
206. Sheng, Y. H., Hasnain, S. Z., Florin, T. H. J., & McGuckin, M. A. Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. — 2012. — 27(1). — 28–38. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06909.x
207. Shi, H., Chang, Y., Gao, Y., Wang, X., Chen, X., Wang, Y., Xue, C., & Tang, Q. Dietary fucoidan of *Acaudina molpadioides* alters gut microbiota and mitigates intestinal mucosal injury induced by cyclophosphamide // *Food & Function*. — 2017. — 8(9). — 3383–3393. doi: 10.1039/c7fo00932a
208. Shin, N.-R., Whon, T. W., & Bae, J.-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota // *Trends in Biotechnology*. — 2015. — 33(9). — 496–503. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.011
209. Shirazi, T., Longman, R. J., Corfield, A. P., & Probert, C. S. Mucins and inflammatory bowel disease // *Postgraduate Medical Journal*. — 2000. — 76(898). — 473–478. doi: 10.1136/pmj.76.898.473
210. Singh, B. N. Lipophosphoglycan-like glycoconjugate of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* // *Molecular and Biochemical Parasitology*. — 1993. — 57(2). — 281–294. doi: 10.1016/0166-6851(93)90204-b
211. Singh, B. N., BonDurant, R. H., Campero, C. M., & Corbeil, L. B. Immunological and biochemical analysis of glycosylated surface antigens and lipophosphoglycan of *Tritrichomonas foetus* // *The Journal of Parasitology*. — 2001. — 87(4). — 770–777. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0770:IABAOG]2.0.CO;2
212. Singh, B. N., Lucas, J. J., Beach, D. H., Shin, S. T., & Gilbert, R. O. Adhesion of *Tritrichomonas foetus* to Bovine Vaginal Epithelial Cells // *Infection and Immunity*. — 1999. — 67(8). — 3847–3854.
213. Sokol, H., Seksik, P., Furet, J. P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., & Doré, J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota // *Inflammatory Bowel Diseases*. — 2009. — 15(8). — 1183–1189. doi:

- 10.1002/ibd.20903
214. Somasundaram, R., Nuij, V. J. A. A., van der Woude, C. J., Kuipers, E. J., Peppelenbosch, M. P., & Fuhler, G. M. Peripheral Neutrophil Functions and Cell Signalling in Crohn's Disease // *PLoS ONE*. — 2013. — 8(12). — e84521. doi: 10.1371/journal.pone.0084521
215. Sood, A., Midha, V., Makharia, G. K., Ahuja, V., Singal, D., Goswami, P., & Tandon, R. K. The Probiotic Preparation, VSL#3 Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderately Active Ulcerative Colitis // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. — 2009. — 7(11). doi: 10.1016/j.cgh.2009.07.016
216. Staffas, A., Burgos da Silva, M., Slingerland, A. E., Lazrak, A., Bare, C. J., Holman, C. D., Docampo, M. D., Shono, Y., Durham, B., Pickard, A. J., Cross, J. R., Stein-Thoeringer, C., Velardi, E., Tsai, J. J., Jahn, L., Jay, H., Lieberman, S., Smith, O. M., Pamer, E. G., ... van den Brink, M. R. M. Nutritional Support from the Intestinal Microbiota Improves Hematopoietic Reconstitution after Bone Marrow Transplantation in Mice // *Cell Host and Microbe*. — 2018. — 23(4). — 447-457.e4. doi: 10.1016/j.chom.2018.03.002
217. Sterzenbach, T., Lee, S. K., Brenneke, B., Von Goetz, F., Schauer, D. B., Fox, J. G., Suerbaum, S., & Josenhans, C. Inhibitory Effect of Enterohepatic *Helicobacter hepaticus* on Innate Immune Responses of Mouse Intestinal Epithelial Cells // *Infection and Immunity*. — 2007. — 75(6). — 2717–2728. doi: 10.1128/IAI.01935-06
218. Strugala, V., Dettmar, P. W., & Pearson, J. P. Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease // *International Journal of Clinical Practice*. — 2008. — 62(5). — 762–769. doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01665.x
219. Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Theissig, F., Engelhardt, H., Bengmark, S., Koch, S., Lochs, H., & Dörffel, Y. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. — *Gut*. — 2007. — 56(3). — 343–350. doi: 10.1136/gut.2006.098160
220. Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., & Juge, N. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome // *Frontiers in Genetics*. — 2015. — 6. — 81. doi: 10.3389/fgene.2015.00081
221. Takahashi, K., Nishida, A., Fujimoto, T., Fujii, M., Shioya, M., Imaeda, H., Inatomi, O., Bamba, S., Andoh, A., & Sugimoto, M. Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease // *Digestion*. — 2016. — 93(1). — 59–65. doi: 10.1159/000441768
222. Thomson, J. M., Hansen, R., Berry, S. H., Hope, M. E., Murray, G. I., Mukhopadhyay, I., McLean, M. H., Shen, Z., Fox, J. G., El-Omar, E., & Hold, G. L. Enterohepatic *Helicobacter* in Ulcerative Colitis: Potential Pathogenic Entities? // *PLoS ONE*. — 2011. — 6(2). — e17184. doi: 10.1371/journal.pone.0017184

223. Tolbert, M. K., & Gookin, J. L. Mechanisms of *Tritrichomonas foetus* Pathogenicity in Cats with Insights from Venereal Trichomonosis // *Journal of Veterinary Internal Medicine*. — 2016. — 30(2). — 516–526. doi: 10.1111/jvim.13920
224. Trifinopoulos, J., Nguyen, L.-T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis // *Nucleic Acids Research*. — 2016. — 44(Web Server issue). — W232–W235. doi: 10.1093/nar/gkw256
225. Tursi, A., Brandimarte, G., Papa, A., Giglio, A., Elisei, W., Giorgetti, G. M., Forti, G., Morini, S., Hassan, C., Pistoia, M. A., Modeo, M. E., Rodino', S., D'Amico, T., Sebkova, L., Sacca', N., Di Giulio, E., Luzzza, F., Imeneo, M., Larussa, T., ... Gasbarrini, A.. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: A double-blind, randomized, placebo-controlled study // *American Journal of Gastroenterology*. — 2010. — 105(10). — 2218–2227. doi: 10.1038/ajg.2010.218
226. Tysk, C., Riedesel, H., Lindberg, E., Panzini, B., Podolsky, D., & Järnerot, G. Colonic glycoproteins in monozygotic twins with inflammatory bowel disease // *Gastroenterology*. — 1991. — 100(2). — 419–423.
227. Tytgat, K. M. A. J., van der Wal, J.-W. G., Einerhand, A. W. C., Büller, H. A., & Dekker, J. Quantitative Analysis of MUC2 Synthesis in Ulcerative Colitis // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 1996. — 224(2). — 397–405. doi: 10.1006/bbrc.1996.1039
228. Ungaro, R., Bernstein, C. N., Garry, R., Hviid, A., Kolho, K.-L., Kronman, M. P., Shaw, S., Van Kruiningen, H., Colombel, J.-F., & Atreja, A. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis // *The American Journal of Gastroenterology*. — 2014. — 109(11). — 1728–1738. doi: 10.1038/ajg.2014.246
229. Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Ismail, A. S., Eckmann, L., & Hooper, L. V. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2008. — 105(52). — 20858–20863. doi: 10.1073/pnas.0808723105
230. Van der Sluis, M., De Koning, B. A. E., De Bruijn, A. C. J. M., Velcich, A., Meijerink, J. P. P., Van Goudoever, J. B., Büller, H. A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I. B., & Einerhand, A. W. C. Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection // *Gastroenterology*. — 2006. — 131(1). — 117–129. doi: 10.1053/j.gastro.2006.04.020
231. van der Waaij, L. A., Kroese, F. G., Visser, A., Nelis, G. F., Westerveld, B. D., Jansen, P. L., & Hunter, J. O. Immunoglobulin coating of faecal bacteria in inflammatory bowel disease // *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. — 2004. — 16(7). — 669–674. doi: 10.1097/01.meg.0000108346.41221.19

232. Van Klinken, B. J.-W., Van der Wal, J.-W. G., Einerhand, A. W. C., Buller, H. A., & Dekker, J. Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis // *Gut*. — 1999. — 44(3). — 387–393. doi: 10.1136/gut.44.3.387
233. Varela, E., Manichanh, C., Gallart, M., Torrejón, A., Borrueal, N., Casellas, F., Guarner, F., & Antolin, M. Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. — 2013. — 38(2). — 151–161. doi: 10.1111/apt.12365
234. Velcich, A., Yang, W. C., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., & Augenlicht, L. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin *Muc2* // *Science*. — 2002. — 295(5560). — 1726–1729. doi: 10.1126/science.1069094
235. Vetrano, S., Rescigno, M., Rosaria Cera, M., Correale, C., Rumio, C., Doni, A., Fantini, M., Sturm, A., Borroni, E., Repici, A., Locati, M., Malesci, A., Dejana, E., & Danese, S. Unique Role of Junctional Adhesion Molecule-A in Maintaining Mucosal Homeostasis in Inflammatory Bowel Disease // *Gastroenterology*. — 2008. — 135(1). — 173–184. doi: 10.1053/j.gastro.2008.04.002
236. Vieira, A. T., Fukumori, C., & Ferreira, C. M. New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases // *Clinical & Translational Immunology*. — 2016. — 5(6). — e87. doi: 10.1038/cti.2016.38
237. Virta, L., Auvinen, A., Helenius, H., Huovinen, P., & Kolho, K.-L. Association of Repeated Exposure to Antibiotics With the Development of Pediatric Crohn's Disease--A Nationwide, Register-based Finnish Case-Control Study // *American Journal of Epidemiology*. — 2012. — 175(8). — 775–784. doi: 10.1093/aje/kwr400
238. Vivinus-Nébot, M., Frin-Mathy, G., Bziouche, H., Dainese, R., Bernard, G., Anty, R., Filippi, J., Saint-Paul, M. C., Tulic, M. K., Verhasselt, V., Hébuterne, X., & Piche, T. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation // *Gut*. — 2014. — 63(5). — 744–752. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304066
239. Wacklin, P., Mäkivuokko, H., Alakulppi, N., Nikkilä, J., Tenkanen, H., Råbinä, J., Partanen, J., Aranko, K., & Mättö, J. Secretor Genotype (*FUT2* gene) Is Strongly Associated with the Composition of Bifidobacteria in the Human Intestine // *PLoS ONE*. — 2011. — 6(5). — e20113. doi: 10.1371/journal.pone.0020113
240. Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J., & Strober, W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses // *Nature Immunology*. — 2004. — 5(8). — 800–808. doi: 10.1038/ni1092
241. Wenzel, U. A., Magnusson, M. K., Rydström, A., Jonstrand, C., Hengst, J., Johansson, M.

- E., Velcich, A., Öhman, L., Strid, H., Sjövall, H., Hansson, G. C., & Wick, M. J. Spontaneous Colitis in Muc2-Deficient Mice Reflects Clinical and Cellular Features of Active Ulcerative Colitis // *PLoS ONE*. — 2014. — 9(6). — e100217. doi: 10.1371/journal.pone.0100217
242. Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M. L., Bouet, S., Chevalier-Curt, M. J., Robert, V., Philippe, C., Bridonneau, C., Cherbuy, C., Robbe-Masselot, C., Langella, P., & Thomas, M. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent // *BMC Biology*. — 2013. — 11. — 61. doi: 10.1186/1741-7007-11-61
243. Wu, G., Niu, M., Tang, W., Hu, J., Wei, G., He, Z., Chen, Y., Jiang, Y., & Chen, P. l-Fucose ameliorates high-fat diet-induced obesity and hepatic steatosis in mice // *Journal of Translational Medicine*. — 2018. — 16(1). — 344. doi: 10.1186/s12967-018-1718-x
244. Wu, M., Wu, Y., Li, J., Bao, Y., Guo, Y., & Yang, W. The dynamic changes of gut microbiota in muc2 deficient mice // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2018. — 19(9). — 2809. doi: 10.3390/ijms19092809
245. Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease // *Nature*. — 2007. — 448(7152). — 427–434. doi: 10.1038/nature06005
246. Yang, J. H., Bhargava, P., McCloskey, D., Mao, N., Palsson, B. O., & Collins, J. J. Antibiotic-Induced Changes to the Host Metabolic Environment Inhibit Drug Efficacy and Alter Immune Function // *Cell Host and Microbe*. — 2017. — 22(6). — 757-765.e3. doi: 10.1016/j.chom.2017.10.020
247. Yang, K., Popova, N. V., Yang, W. C., Lozonschi, I., Tadesse, S., Kent, S., Bancroft, L., Matisse, I., Cormier, R. T., Scherer, S. J., Edelmann, W., Lipkin, M., Augenlicht, L., & Velcich, A. Interaction of Muc2 and Apc on Wnt Signaling and in Intestinal Tumorigenesis: Potential Role of Chronic Inflammation // *Cancer Research*. — 2008. — 68(18). — 7313-7322. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0598
248. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics*. — 2012. — 13(1). — 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134
249. Yu, Q. T., Saruta, M., Avanesyan, A., Fleshner, P. R., Banham, A. H., & Papadakis, K. A. Expression and functional characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis // *Inflammatory Bowel Diseases*. — 2007. — 13(2). — 191–199. doi: 10.1002/ibd.20053
250. Zarepour, M., Bhullar, K., Montero, M., Ma, C., Huang, T., Velcich, A., Xia, L., & Vallance, B. A. The Mucin Muc2 Limits Pathogen Burdens and Epithelial Barrier Dysfunction during *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis // *Infection and Immunity*. — 2013. —

- 81(10). — 3672–3683. doi: 10.1128/IAI.00854-13
251. Zeissig, S., Burgel, N., Gunzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M., & Schulzke, J.-D. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease // *Gut*. — 2007. — 56(1). — 61–72. doi: 10.1136/gut.2006.094375
252. Zeng, M. Y., Inohara, N., & Nuñez, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut // *Mucosal Immunology*. — 2017. — 10(1). — 18–26. doi: 10.1038/mi.2016.75
253. Zhang, L., Day, A., McKenzie, G., & Mitchell, H. Nongastric *Helicobacter* Species Detected in the Intestinal Tract of Children // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2006. — 44(6). — 2276–2279. doi: 10.1128/JCM.02017-05
254. Zhang, Y.-Z., & Li, Y.-Y. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis // *World Journal of Gastroenterology*. — 2014. — 20(1). — 91. doi: 10.3748/wjg.v20.i1.91
255. Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences // *Journal of Computational Biology*. — 2000. — 7(1–2). — 203–214. doi: 10.1089/10665270050081478

ПРИЛОЖЕНИЯ

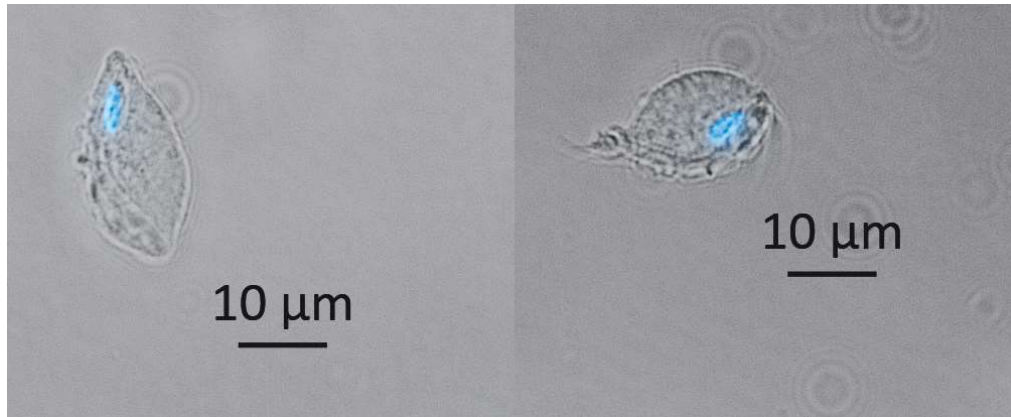
Приложение №1. Последовательности праймерных олигонуклеотидов

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Мишень	Источник
Mus28S-F	CCTGGCGCTAAACCATTCGT	28S rRNA, <i>Mus musculus</i>	Разработаны в лаборатории
Mus28S-R	AAAGCCCCGAGAGACAAACC		
16S-F	TCCTACGGGAGGCAGCAG	16S rRNA, <i>Bacteria</i>	
16S-R	ATTACCGCGGCTGCTGG		
Vac.spp-F	GAGAGGAAGGTCCCCAC	16S rRNA <i>Bacteroides</i> spp.	
Vac.spp-R	CGCTACTTGGCTGGTTCAG		
Lac.spp-F	ATCTTCCACAATGGRCGC	16S rRNA <i>Lactobacillus</i> spp.	
Lac.spp-R	GGCTGCTGGCAGTAGTTAG		
Ecoli-F	GGCAGGCCTAACACATGCAA	16S rRNA <i>Escherichia coli</i>	
Ecoli-R	CCCCTCTTTGGTCTTGCGAC		
Hel.spp-F	CGGAGGGTGCAAGCGTACT	16S rRNA <i>Helicobacter</i> spp.	
Hel.spp-R	ATTCCACCTGCCTCTCCCAC		
Com-F	CAGCAGCCGCGTAATAC	V4 16S rRNA, <i>Bacteria</i> (анализ SSCP)	
Com-R	P-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT		
T18S-F	GGAAGCACACTTCGGTCATAG	18S rRNA <i>Tritrichomonas</i> spp (секвенирование)	<i>Dimasuy et al., 2013</i>
T18S-Ri	CCTTCCGTCAATTCCTTCAA		
T18S-Fi	AGGGTTTCTGTTCGATCAAGG		
T18S-R	CGTTACCTTGTTACGACTTCTCC		
Tsp-F	ATACCGCTTCCTGTTTTCA	<i>Tritrichomonas</i> sp. (отсеквенирован)	Разработаны в лаборатории
Tsp-R	TTGGCAACTCTTTGATCCT		
Muc2-F	CTTGCCCTGCCCTATTGTT	<i>Muc2</i> (генотипирование)	
Muc2-R	AGAAAGCCCTGAAGCAGGA		
Neo-F	TTGCTCCTGCCGAGAAAGTA	Неомициновая кассета, (генотипирование)	
Neo-R	CCTGATGCTCTTCGTCCAGA		
Tgfb1-F	TGACGTCAGTGGAGTTGTAC	мРНК <i>Tgfb1</i> (кДНК)	
Tgfb1-R	AAGAGCAGTGAGCGCTGAAT		
Tnf-F	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	мРНК <i>Tnf</i> (кДНК)	
Tnf-R	GGCACCAGTAGTTGGTTGTCTTT		
Tff3-F	TAATGCTGTTGGTGGTCCTG	мРНК <i>Tff3</i> (кДНК)	
Tff3-R	CAGCCACGGTTGTTACACTG		
Il1b-F	AAGGAGAACCAAGCAACGACAA	мРНК <i>Il1b</i> (кДНК)	
Il1b-R	AACTCTGCAGACTCAAACCTCCA		
Il6-F	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA	мРНК <i>Il6</i> (кДНК)	
Il6-R	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA		
Rorc-F	ACTACGGGGTTATCACCTGT	мРНК <i>Rorc</i> (кДНК)	
Rorc-R	GTGCAGGAGTAGGCCACATT		
Foxp3-F	AGGAGACATCCATCAGGGCT	мРНК <i>Foxp3</i> (кДНК)	
Foxp3-R	TGCTGCTTTAGGTGGAGTGG		
Nos2-F	CAGGGTCACAACCTTACAGGGA	мРНК <i>Nos2</i> (кДНК)	
Nos2-R	CACTTCTGCTCCAAATCCAACG		
Arg1-F	AAGAGCTGGCTGGTGTGGTG	мРНК <i>Arg1</i> (кДНК)	
Arg1-R	ACACAGGTTGCCCATGCAGA		
Ptgs2-F	CCAGCACTTCACCCATCAGT	мРНК <i>Ptgs2</i> (кДНК)	
Ptgs2-R	ACCCAGGTCCTCGCTTATGA		
Tubb5-F	TGAAGCCACAGGTGGCAAGTAT	мРНК <i>Tubb5</i> (кДНК)	
Tubb5-R	CCAGACTGACCGAAAACGAAGT		
Random	NNNNNNN	Синтез кДНК	
Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTT		

R – A или G; N – A, T, C, G случайным образом; Y – C или T случайным образом;
H – A, C или T случайным образом; P – фосфатная группа

Приложение №2. *Tritrichomonas* sp. и последовательности для филогенетического анализа

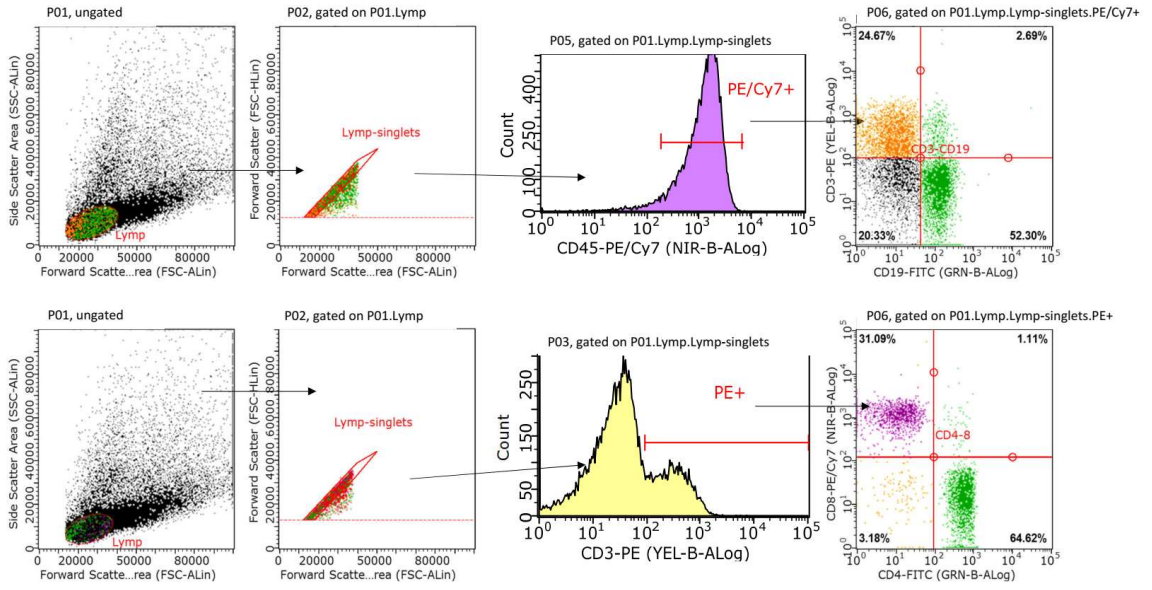
Микрофотография простейшего, обнаруженного в содержимом кишечника *Muc2^{-/-}* мышей. Ядро визуализировано при помощи красителя Hoechst 33258.



Последовательности, использованные для филогенетического анализа отсеквенированной ДНК *Tritrichomonas* sp.

Название микроорганизма	GenBank Accession Number	Схожесть, %
<i>Tritrichomonas</i> sp. strain LL5	MN120899.1	96,55
<i>Tritrichomonas</i> sp. MEG-2016a (<i>Tritrichomonas musculus</i>)	KX000921.1	96,42
<i>Tritrichomonas muris</i>	AY886846.1	96,12
<i>Tritrichomonas suis</i>	MK801504.1	96,02
<i>Tritrichomonas foetus</i>	AF466749.1	96,02
<i>Tritrichomonas augusta</i>	AY055802.1	96,02
<i>Tritrichomonas nonconforma</i>	AY055803.1	96,02
<i>Simplicimonas similis</i>	GQ254637.1	91,06
<i>Monocercomonas colubrorum</i>	DQ174303.1	90,52
<i>Joenia annectens</i>	AB458854.1	90,10
<i>Tetratrichomonas gallinarum</i>	HQ149971.1	88,36

Приложение №3. Схема анализа лимфоцитов в крови



Приложение №4. Схема анализа спленцитов

Схема анализа спленцитов CD3+, CD19+, CD3+CD4+, CD3+CD8+

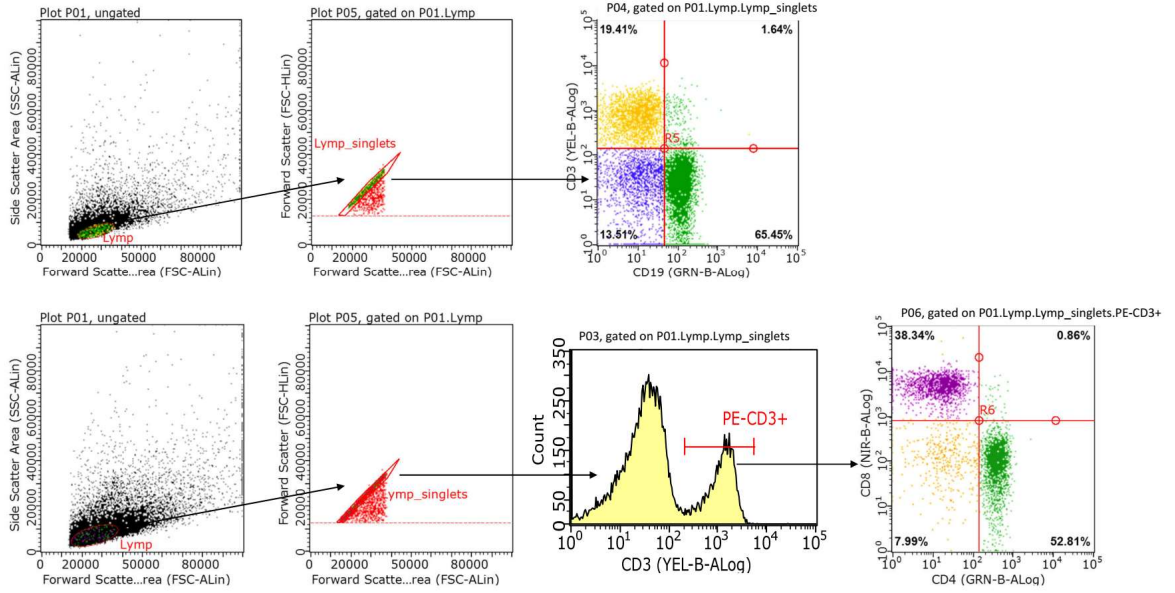
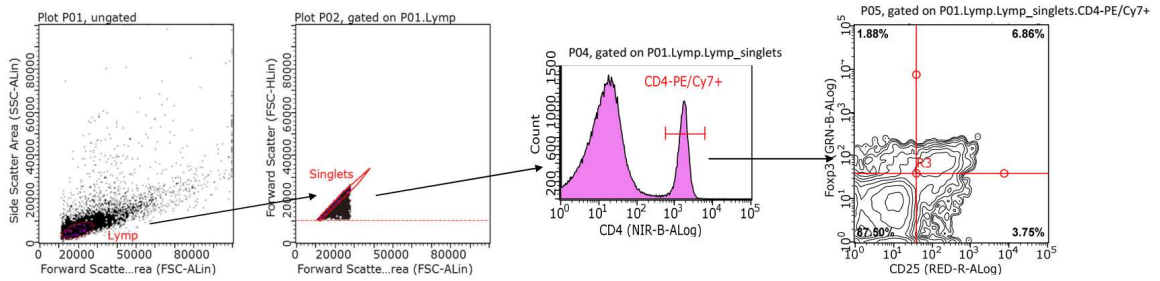
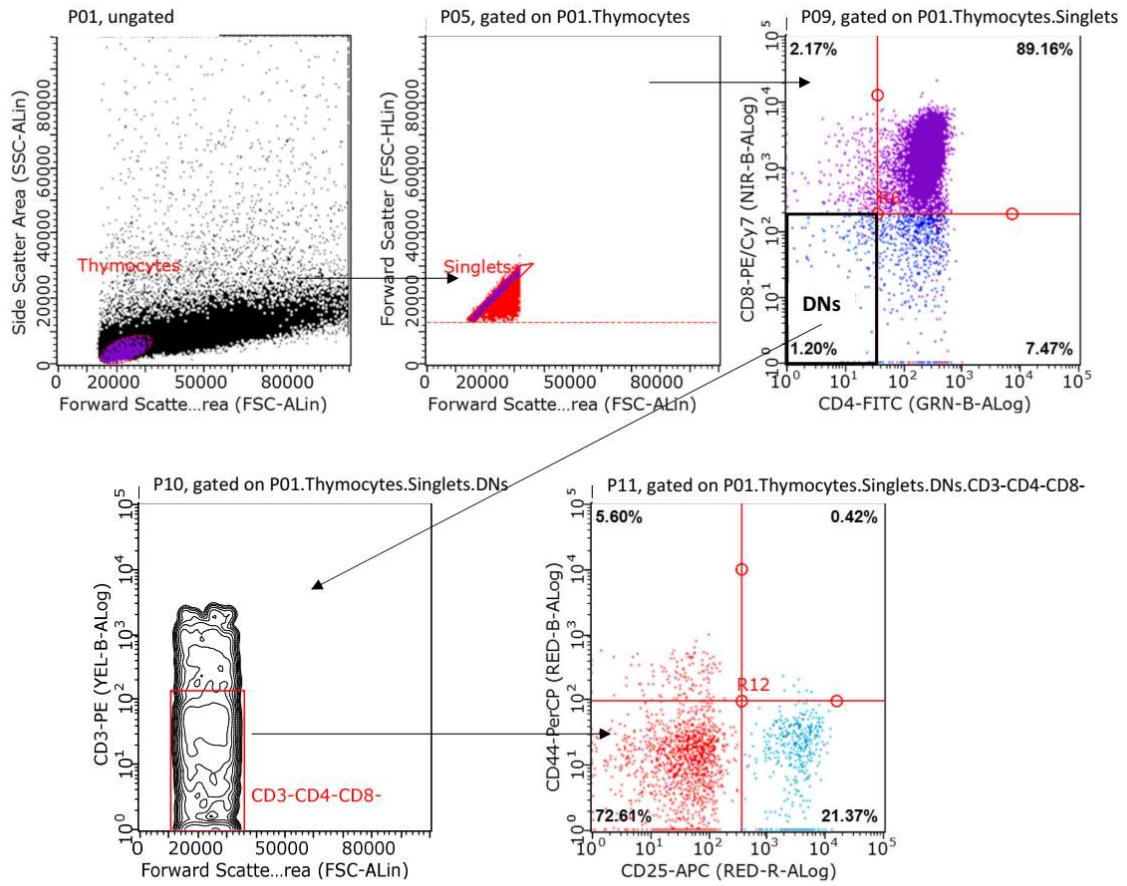


Схема анализа спленцитов CD4+CD25+Foxp3+



Приложение №5. Схема анализа тимоцитов



Приложение №6. Схема анализа лимфоцитов мезентериальных ЛУ

Схема анализа лимфоцитов CD3+, CD19+, CD3+CD4+, CD3+CD8+

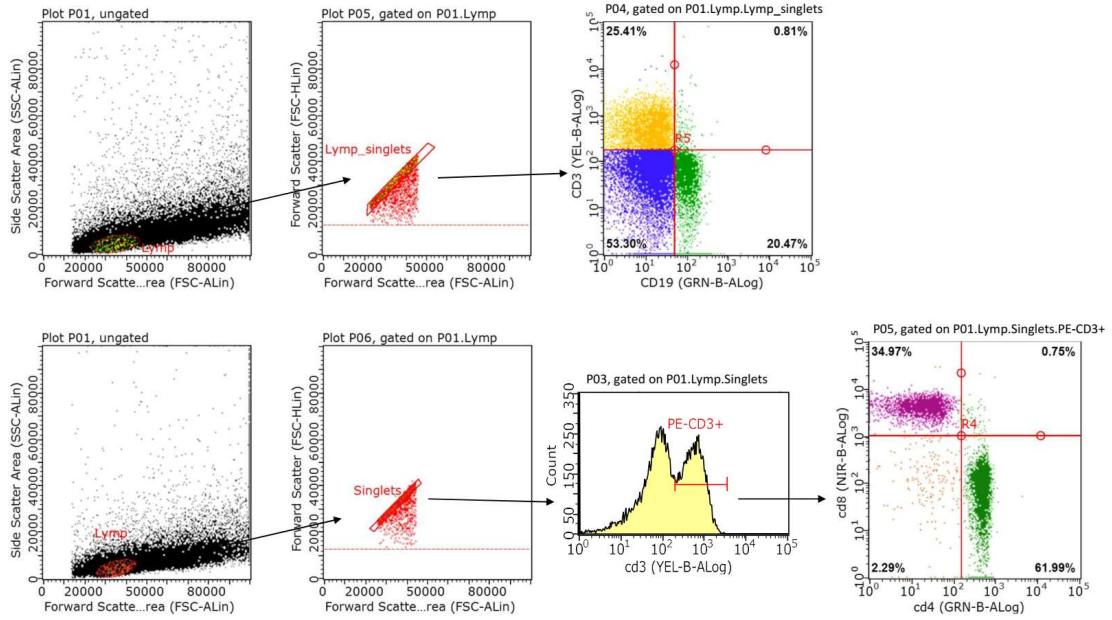
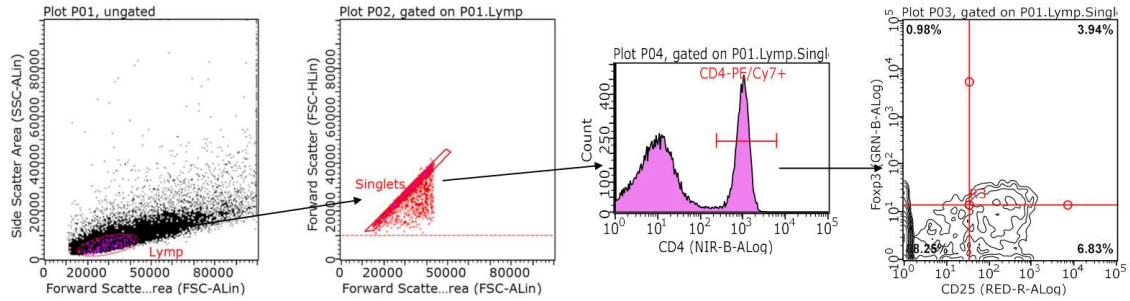
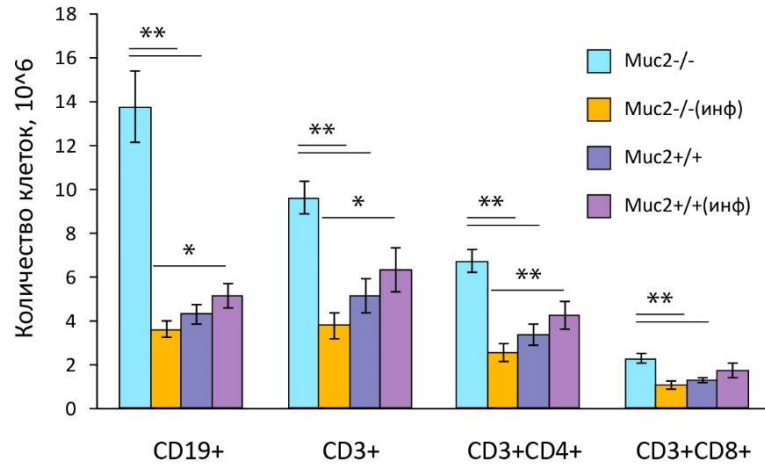


Схема анализа лимфоцитов CD4+CD25+Foxp3+ в мезентериальных ЛУ

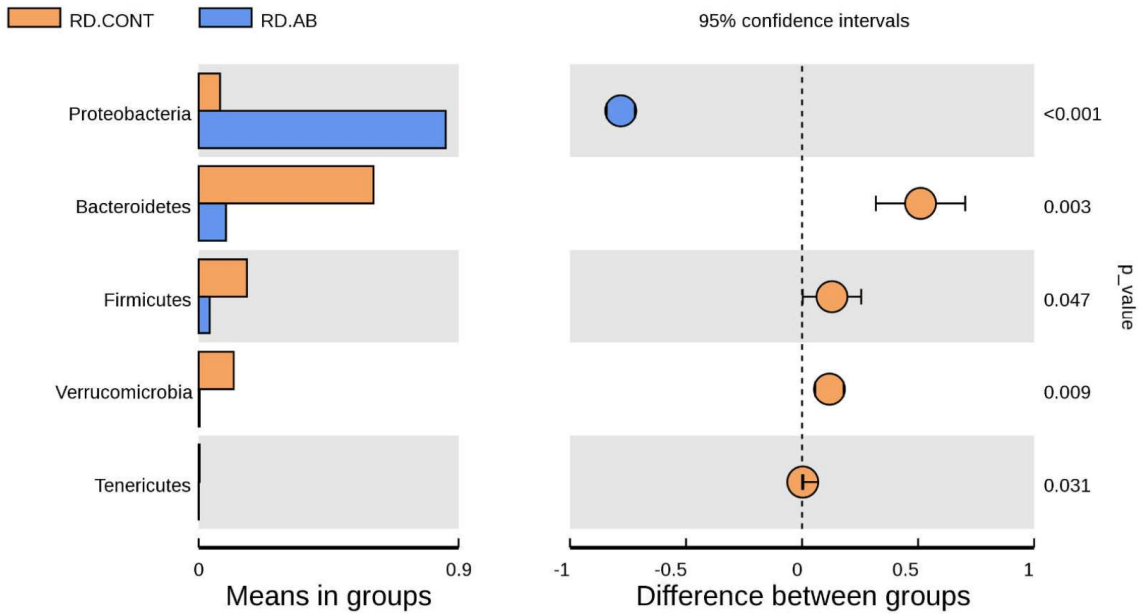


Приложение №7. Количество клеток различных субпопуляций в мезентериальных ЛУ у контрольных мышей *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}*

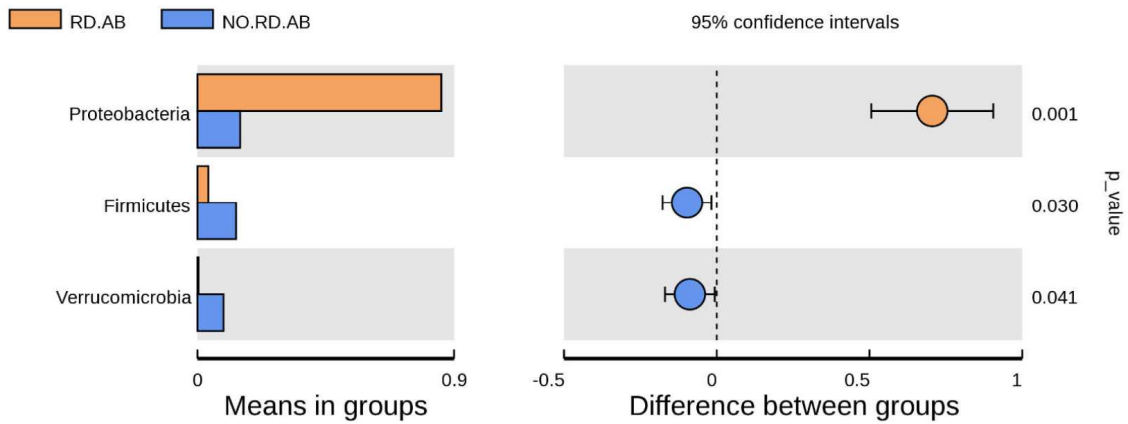


* и ** – различия $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно, Mann-Whitney U-test

Приложение №8. Анализ представленности некоторых ОТЕ (Phylum) в образцах фекалий мышей *Muc2^{-/-}* с инфекциями и без них

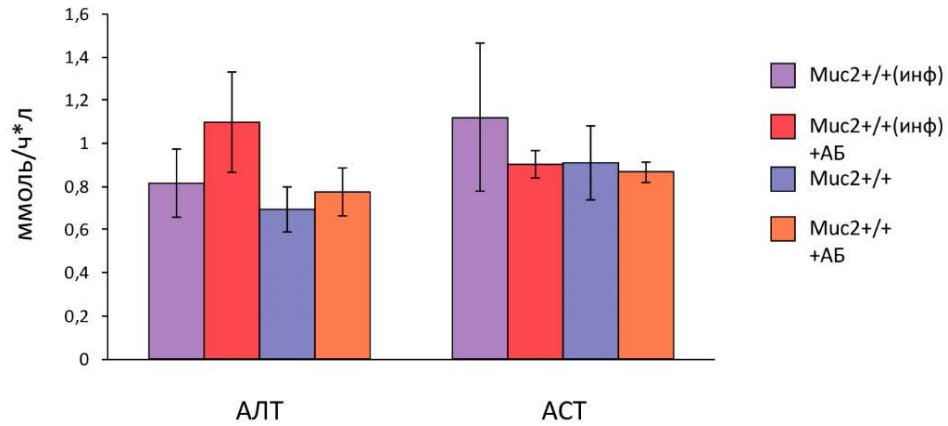


Сравнение ОТЕ (Phylum) в группах мышей *Muc2^{-/-}*, свободных от инфекций, и получавших антибиотики (RD.AB) и воду (RD.CONT – контрольная группа).

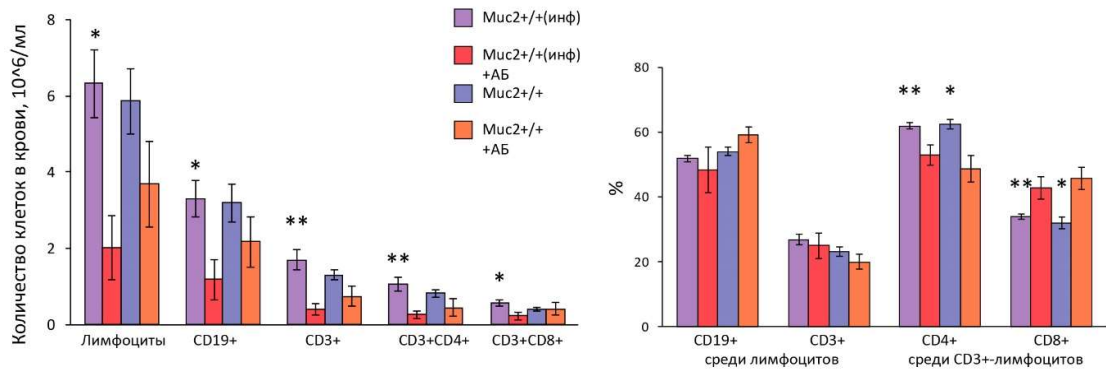


Сравнение ОТЕ (Phylum) в группах мышей *Muc2^{-/-}* с инфекциями и без, получавших антибиотики.

Приложение №9. Концентрация АЛТ и АСТ в крови у *Muc2^{+/+}* мышей до и после приема антибиотиков

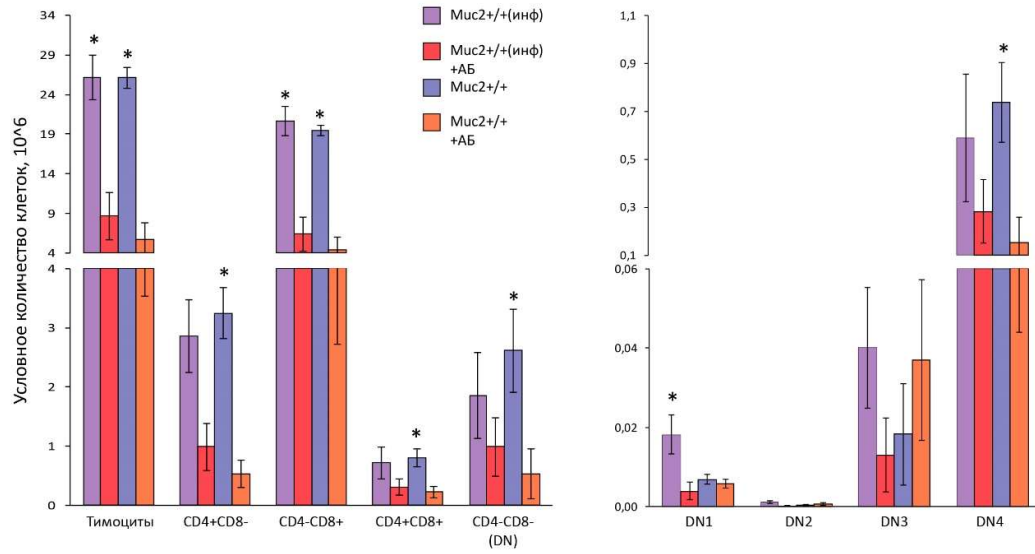


Приложение №10. Лимфоциты в крови у *Muc2^{+/+}* мышей до и после приема антибиотиков



* и ** – различия между контрольной группой и группой, получавшей антибиотики, соответствующего микробиологического статуса $p < 0,05$ и $p < 0,01$; Mann-Whitney U-test.

Приложение №11. Тимоциты мышей *Muc2^{+/+}* до и после приема антибиотиков



* – различия между контрольной группой и группой, получавшей антибиотики, соответствующего микробиологического статуса $p < 0,05$; Mann-Whitney U-test.

Приложение №12. Спленоциты мышей *Muc2^{+/+}* до и после приема антибиотиков

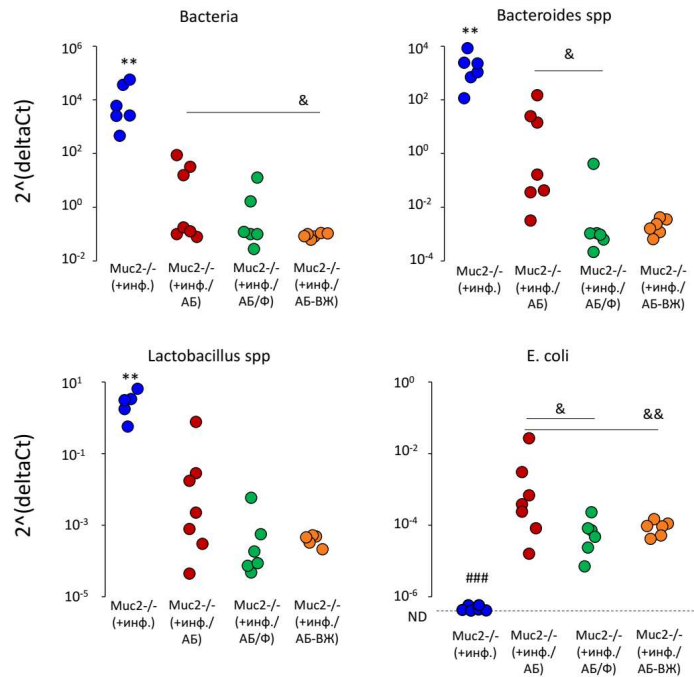
Группа	УКК спленоциты, 10 ⁶	%			
		CD19 ⁺	CD3 ⁺ #,*	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺ #
<i>Muc2^{+/+}</i> (инф)	21,78±3,41	57,75±3,17	18,26±1,98	52,60±1,41	33,79±1,06
<i>Muc2^{+/+}</i> (инф)+АБ	23,24±1,62	62,86±2,22	20,15±1,74	49,86±1,89	37,90±1,24
<i>Muc2^{+/+}</i>	22,15±4,04	56,28±2,95	16,97±1,46	53,55±1,08	34,90±0,80
<i>Muc2^{+/+}</i> +АБ	12,45±3,78	58,72±1,14	26,57±1,54	45,83±2,45	42,50±2,91

УКК – условное количество клеток

- эффект группы, Kruskal-Wallis ANOVA, p<0,05

* - различия между «*Muc2^{+/+}*» и «*Muc2^{+/+}*+АБ» p<0,05; Mann-Whitney U-test

Приложение №13. Количество бактериальной ДНК у мышей *Muc2*^{-/-} после антибиотиков

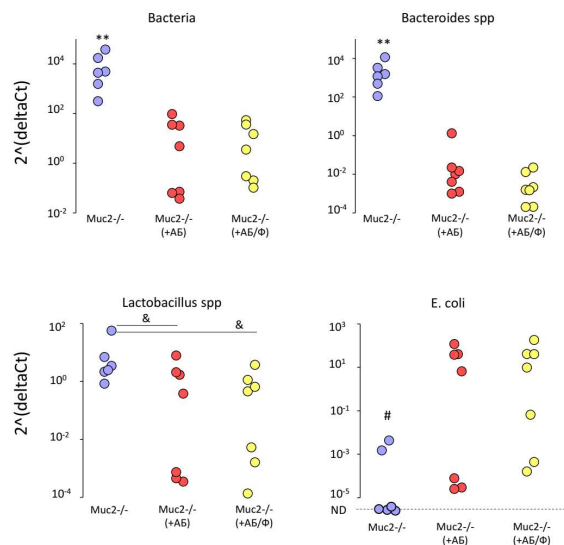


Количество бактериальной ДНК в фекалиях мышей *Muc2*^{-/-}, рожденных с инфекциями (нормировано на 28S rRNA ДНК мыши)

** – $p < 0,01$ отличие от остальных групп, Mann-Whitney U-test

& и && – различия между группами $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно, Mann-Whitney U-test

– $p < 0,001$ отличие от остальных групп, Fisher exact test



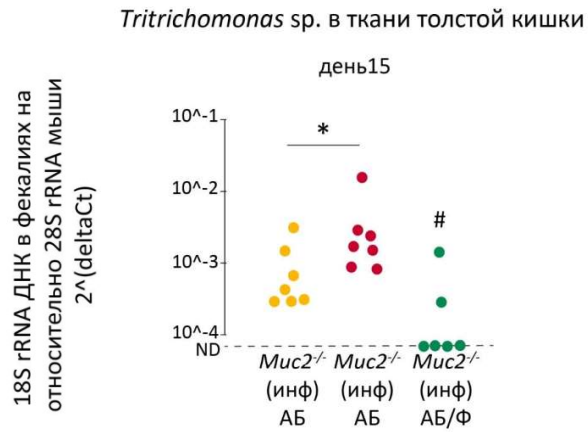
Количество бактериальной ДНК в фекалиях мышей *Muc2*^{-/-}, рожденных без инфекций (нормировано на 28S rRNA ДНК мыши)

** – $p < 0,01$ отличие от остальных групп, Mann-Whitney U-test

& – различия между группами $p < 0,05$ Mann-Whitney U-test

– $p < 0,05$ отличие от остальных групп, Fisher exact test

Приложение №14. Количество ДНК *Tritrichomonas* sp. в толстой кишке у мышей *Muc2*^{-/-} после антибиотиков и L-фукозы



* - $p < 0,05$; Mann-Whitney U-test

- $p < 0,05$; Fisher Exact Test