

УДК 577.29

РОЛЬ ГЛИКОПРОТЕИНА МУЦИН 2 И L-ФУКОЗЫ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ИММУНИТЕТА И МИКРОФЛОРЫ НА ПРИМЕРЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА

© 2022 В.Д. Бец¹, К.М. Ачасова^{2,3}, М.А. Борисова⁴,
Е.Н. Кожевникова^{1,2,3}, Е.А. Литвинова^{2*}

¹ Новосибирский государственный аграрный университет, 630039 Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины,
630117 Новосибирск, Россия; электронная почта: litvinovaea@physiol.ru

³ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия

⁴ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 10.11.2021

После доработки 24.02.2022

Принята к публикации 24.02.2022

В основе развития воспалительных заболеваний кишечника у человека лежит множество факторов. В том числе огромную роль играют дисбаланс микробиоты и истончение мукозального слоя в толстом кишечнике. Патогенные микроорганизмы также усугубляют протекание заболеваний. Было выполнено исследование роли дефицита муцина 2 в формировании микрофлоры кишечника на экспериментальной модели мышей с нокаутом гена *Muc2* в присутствии инфекции *Helicobacter* spp. А также проведена оценка восстанавливающего и противовоспалительного эффекта пищевой L-фукозы у мышей *Muc2*^{-/-} на микрофлору и иммунитет. С этой целью у животных исследовали бактериальное разнообразие в фекалиях до и после применения антибактериальной терапии и оценивали роль пищевой L-фукозы в её восстановлении. Для определения влияния бактериального дисбаланса и роли фукозы на иммунную систему определяли уровни мРНК генов провоспалительных цитокинов (*Tnf*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6*) и транскрипционных факторов Т-клеток (*Foxp3* – Treg, *Rorc* – Th17, *Tbx21* – Th1) в ткани толстой кишки у мышей *Muc2*^{-/-}. Значительная элиминация бактерий на фоне применения антибиотиков вызывала снижение фукозы в кишечнике, а также провоцировала снижение транскрипционного фактора Т-регуляторных клеток (*Foxp3*). При добавлении к антибиотикам пищевой L-фукозы уровень бактериальной ДНК *Bacteroides* spp. в фекалиях мышей *Muc2*^{-/-} частично восстанавливался. В регуляции воспаления у мышей *Muc2*^{-/-} участвуют Т-регуляторные клетки. Антибиотики снижали их количество, что не позволило уменьшить воспалительный ответ на инфекцию. Фукоза, как компонент муцина 2, при антибактериальной терапии мышей *Muc2*^{-/-} помогает сохранить *Bacteroides* spp. и восстановить биохимические показатели, но не влияет на воспалительный ответ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ВЗК, макрофаги, патогены, микробиота, антибиотики, L-фукоза, муцин 2.

DOI: 10.31857/S0320972522030046

ВВЕДЕНИЕ

Во всём мире стремительно набирает темпы распространение воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), в том числе в США и странах Западной Европы отмечают более высокие показатели заболеваемости язвенным колитом (ЯК) и болезнью Крона (БК), чем в других странах мира. По последним данным, в США и Европе более 3 млн больных ВЗК. В России же эти

показатели, по опубликованным данным, составляют 4,1 на 100 тыс. населения для ЯК и 0,8 на 100 тыс. – для БК. Ежегодный прирост заболеваемости составляет 5–20 случаев на 100 тыс. населения, и этот показатель продолжает увеличиваться [1].

В этиологии ВЗК лежат полифакторные компоненты, среди которых отмечают: генетическую предрасположенность, изменение состава микробиоты кишечника, применение различного рода лекарственных препаратов (в том числе и антибиотиков), дисбаланс механизмов адаптивной и врождённой иммунных систем, а также влияние диет и факторов окружающей среды [2]. Особую роль в развитии ВЗК играет рацион питания. Диета способна оказывать

Принятые сокращения: БК – болезнь Крона; ВЗК – воспалительные заболевания кишечника; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ЯК – язвенный колит; DSS – декстран сульфат натрия; Treg – Т-регуляторные клетки.

* Адресат для корреспонденции.

сильное влияние на состав микрофлоры кишечника, вызывая дисбиоз, повреждая слизистый слой, что, в свою очередь, повышает проницаемость тканей кишечника и создаёт благоприятные условия для адгезии и развития патогенной и условно-патогенной микрофлоры [3]. Существуют данные о росте показателей БК и ЯК в некоторых районах Азии в связи с вестернизацией рациона, характеризующейся преобладанием пищи с высоким содержанием жиров, животного белка, сахара и снижением потребления клетчатки [4].

Поскольку микробиом кишечника является уникальной экосистемой, вовлечённой практически во все процессы жизнедеятельности макроорганизма, важно учитывать особо тесное взаимодействие бактериального сообщества с иммунной системой хозяина, которое начинается на ранних стадиях онтогенеза и сопровождает всю жизнь [5, 6]. По последним данным, микробиом кишечника человека формируется до 5-летнего возраста [7].

Ещё одной причиной развития ВЗК считают иммунную реакцию на одного или нескольких представителей микрофлоры кишечника [8]. Бактериальные агенты в составе кишечной микробиоты способны запускать как воспалительные, так и противовоспалительные процессы в организме хозяина [9]. Так, например на безмикробных мышях (germ-free) было показано, что животные с отсутствием бактерий в просвете кишечника имеют менее развитую иммунную систему по сравнению с животными, выращенными в обычных условиях [6]. У безмикробных мышей регистрировали меньшее количество Пейеровых бляшек и брыжеечных лимфатических узлов, а также у некоторых мышей в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) отсутствуют подтипы Т-хелперов [10].

Терапия ВЗК на данный момент ориентирована на снижение патогенной нагрузки и уменьшение альтерации тканей кишечника с помощью стероидных противовоспалительных препаратов и антибиотиков [11]. Антибактериальная терапия влияет на изменение микробиомного состава, что способствует разрастанию патогенной микрофлоры. Побочными эффектами могут быть диарея, вызванная инфекционными бактериями *Clostridium difficile* и *Salmonella typhimurium*, а также различные аутоиммунные заболевания [9]. *Helicobacter pylori* — широко распространённый возбудитель инфекции желудка среди людей, другие виды *Helicobacter* также являются серьёзной проблемой для лабораторных грызунов [12]. На сегодняшний день у мышей описаны следующие виды *Helicobacter*: *H. bilis*, *H. ganmani*, *H. hepaticus*, *H. muridarum*,

H. mastomyrinus, *H. rappini*, *H. rodentium* и *H. typhlonius*. Видами *Helicobacter*, связанными с клиническими заболеваниями у крыс и мышей, в первую очередь являются *H. bilis* и *H. Hepaticus* [13]. При этом *H. pylori*, характерный для человека, у заражённых мышей FVB/N-Tg (Ins1-GAS)1Sbr/J нарушал состав микрофлоры желудка [14]. Кроме того, есть предположение, что вызванная *H. pylori* патология желудка у мышей линии C57BL/6 может быть ослаблена сочетанной инфекцией *H. bilis* или *H. muridarum* или стимулироваться сочетанной инфекцией *H. hepaticus*, все они являются энтерогепатическими хеликобактерами, преимущественно колонизирующими толстую кишку [15, 16]. Недавнее исследование продемонстрировало, что инфекция *H. pylori* у мышей C57BL/6 изменяет как желудочный, так и кишечный микробный состав, а также модулирует иммунные ответы хозяина как в желудке, так и в лёгких [14].

Что касается энтерогепатических видов *Helicobacter* (Enterohepatic *Helicobacter*, ЕНН), то на животных моделях было показано, что *H. hepaticus* и *H. bilis* вызывают стойкое воспаление в толстой и слепой кишках у иммунодефицитных грызунов [15, 16]. *H. hepaticus* вызывает колит у мышей с дефицитом интерлейкина 10 (IL-10), свободных от других патогенов, посредством механизма, зависящего от интерлейкина 12 (IL-12) и интерферона-гамма (IFN-gamma) [15]. *H. muridarum* усиливает воспаление в модели острого колита [17] и провоцирует БК-подобное воспаление у мышей с тяжёлым комбинированным иммунодефицитом при получении Т-клеток [18].

Применение пробиотиков и пребиотиков в качестве поддерживающей терапии показало хорошие результаты при синдроме раздражённого кишечника (СРК) и у пациентов с *C. difficile* [19], однако не столь эффективно при средней и высокой степени тяжести ВЗК и не всегда способствуя восстановлению деятельности кишечной микрофлоры и снижению воспалительного процесса в тканях кишечника [20].

Для коррекции микробиомных отклонений у пациентов с ЯК была предпринята попытка применения заместительной терапии в форме трансплантации кала от здоровых пациентов. Однако наряду с положительными результатами исследований, остаётся не раскрытым до конца вопрос побочных действий данной методики и вопросы контроля исследований [21]. Недавние исследования на эту тему дают основание полагать, что этот подход способен работать и в обратную (негативную для здоровья пациента) сторону. Показано, что микроорганизмы, вызывающие воспаление кишечника, но не проявля-

ющиеся у донора, могут негативно влиять на реципиента с ВЗК [20].

Помимо медикаментозной и диетической поддержки пациента с ВЗК, существуют также хирургические методы лечения, применение которых определяется степенью тяжести поражения тканей, площадью поражения и проявлением внекишечных симптомов. Здесь также существуют факторы риска послеоперационных осложнений, в частности резервуарит, как частое осложнение при ИАРА (илеоанальный резервуарный анастомоз), а также воспаление слизистой оболочки прямой кишки, сохраняемое при наложении аппаратного анастомоза [11].

Таким образом, на сегодняшний день нет эффективного способа лечения ВЗК, и эти патологии остаются объектом пристального внимания исследователей. В связи с этим актуальными являются поиски способов облегчения состояния пациентов с ВЗК и увеличения периода ремиссии.

На всех этапах изучения острого и хронического воспаления кишечника использовали различные модели на животных – от беспозвоночных (нематод, дрозофил, кишечнополостных) [22], используемых для изучения механизмов врождённого иммунитета, до свиней, как альтернативной модели млекопитающих с морфофункциональной схожестью ЖКТ человека [23]. Также используют модели на приматах, которые обеспечивают более сопоставимые данные из-за их высокой степени генетического и физиологического родства с человеком. Однако существуют проблемы этического характера и опасность переноса высоковирулентных зоонозных агентов [24, 25]. Есть модели воспаления кишечника на кроликах, морских свинках [26] и, в меньшей степени, жвачных животных. Например, овца (как биологическая модель) использовалась для исследований кишечника, но, в отличие от моногастричных видов (*Homo sapiens*, грызуны и свиньи), большая часть бактериальной ферментации углеводов у овец, как правило, происходит в рубце, а не в толстом кишечнике [27]. Есть модели ВЗК на собаках, так как у них проявляется дисфункция генов, аналогичная людям с БК [28]. Несмотря на огромный выбор моделей, оптимальными являются лабораторные грызуны, среди которых мыши играют значимую роль, поскольку морфофункциональное развитие их кишечника относительно похоже на развитие кишечника человека и у них есть многие из тех же иммунных ответов и генов [29, 30].

Модели мышей с ВЗК можно разделить на 3 категории: индуцируемые химическим путём, полученные путём адоптивного переноса

субпопуляций Т-клеток и развивающиеся спонтанно у генетически модифицированных мышей (например, мыши *Il10^{-/-}*) [31].

Химически-индуцированный колит вызывают добавлением отрицательно заряженного сульфатированного полисахарида, декстрана сульфата натрия (DSS), который повреждает эпителиальные клетки. Врождённые иммунные клетки в ответ на альтерацию тканей выделяют цитокины, вызывая воспаление в толстой кишке, которое характеризуется язвами и инфильтрацией гранулоцитов [32]. Ещё одна химически-индуцированная модель – это использование тринитробензолсульфокислоты (TNBS) для изучения иммунологических аспектов БК, так как кислота вызывает Th1-опосредованный иммунный ответ, характеризующийся инфильтрацией клеток Т-хелперов, нейтрофилов и макрофагов в окружающие ткани [32]. Все модели мышей с ВЗК, которые индуцируются химическим путём, имеют общую тенденцию повреждения тканей кишечника, что вызывает воспалительную реакцию. Важно отметить, что поражения кишечника, наблюдаемые у людей с ВЗК, не идентичны повреждениям, наблюдаемым у мышей после воздействия химических агентов. Например, введение DSS мышам вызывает химическое повреждение эпителиальной выстилки, которое имитирует повреждение слизистой оболочки, наблюдаемое у людей с ЯК, тяжесть повреждений не всегда является репрезентативной для людей с ЯК [30, 33].

Существует модель воспаления кишечника с переносом адоптивных Т-клеток, которая способствует развитию хронического воспаления тонкой и толстой кишок. Для создания такой модели Т-клетки CD4⁺CD45RB^{high} (которые являются CD25⁻) сортируются и выделяются из донорских спленоцитов мышей линии BALB/c; при переносе клеток сингенному иммунодефицитному реципиенту *Prkdc^{SCID}* или *Rag2^{-/-}* создаётся модель первичного воспаления в толстой кишке. Это воспаление объясняется отсутствием Т-регуляторных клеток (Treg) в популяции наивных Т-клеток у реципиента. Поэтому модель адаптивного переноса Т-клеток используется для изучения роли патогенных Т-клеток в воспалении слизистой оболочки, и на этой модели было выполнено множество исследований Treg и других популяций Т-клеток [33].

Также существует более 74 видов генетически модифицированных линий мышей. Некоторые из них несут гены восприимчивости, идентифицированные при ВЗК человека, и функции некоторых других генов восприимчивости к ВЗК [34]. Основная концепция генетически спроектированных моделей воспаления заключается в нока-

уте гена, определяющего морфофункциональные особенности строения кишечника и особенности иммунного ответа. Так, на примере модели мышей с конститутивным нокаутом *Il10*^{-/-} показано спонтанное развитие колита, поскольку Treg этих животных неспособны продуцировать IL-10. В частности, наблюдается воспаление толстой кишки, характеризующееся воспалительным инфильтратом лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов [34]. Другая трансгенная модель — это мыши с нуль-мутацией гена *Muc2*, кодирующего белок муцин 2, который участвует в формировании защитного муцинового слоя в тонкой и толстой кишке [35, 36]. Таким образом, различные методы воспроизведения воспаления на мышах используются при определённых поставленных задачах исследования. Однако стоит отметить, что модели с генетическим нокаутом точно определяют фено- и генотипические особенности с рождения, что может играть важную роль при решении определённых задач, в то время как все остальные модели с повреждением и переносом Т-клеток — приобретённые, что может накладывать отпечаток на результаты исследования и их последующий анализ.

Известно, что признаком всех моделей ВЗК является истончение мукозального слоя кишечника и изменение кишечной микрофлоры [37, 38]. Основным компонентом слизистой оболочки кишечника является гликозилированный белок (муцин 2) с терминальными молекулами фукозы и сиаловой кислоты. Моносахариды служат не просто источником энергии, но и фактором вирулентности для кишечных бактерий [39–41]. Несмотря на активное изучение взаимного влияния друг на друга иммунитета и кишечной микрофлоры, механизм развития воспаления при ВЗК до сих пор остаётся не раскрытым. Ранее было показано, что L-фукоза влияет на репродуктивную функцию у мышей *Muc2*^{+/-}. В этом исследовании было обнаружено, что пищевая фукоза может действовать как дифференциальный регулятор поляризации макрофагов во время имплантации в зависимости от иммунного статуса хозяина [42]. Также было установлено, что L-фукоза помогает элиминировать протозойную инфекцию у мышей *Muc2*^{-/-} и способна восстанавливать триптофан-продуцируемые бактерии в кишечнике при DSS-индуцируемом колите [36, 43–46].

В представленной работе мы показали, что отсутствие муцина 2 и входящих в его состав моносахаридов влияют на разнообразие микрофлоры кишечника в присутствии инфекции *Helicobacter* spp., а также что обеднение симбиотической и патогенной микрофлоры на фоне приёма антибиотиков меняет характер воспали-

ния на примере экспериментальной модели ВЗК мышей *Muc2*^{-/-}. Мы продемонстрировали, как пищевая L-фукоза оказывает восстанавливающий эффект на микрофлору кишечника и оказывает противовоспалительное действие у мышей *Muc2*^{-/-}.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные, условия содержания. Исследование проводилось в Центре генетических ресурсов ИЦиГ СО РАН (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015). Все манипуляции с животными были одобрены межинститутской комиссией по биоэтике СО РАН (номер 18.6 от 14.10.2013). В исследовании использовали животных SPF-статуса — свободных от специфических патогенов, которые входят в расширенный список, рекомендованный FELASA в 2014 г. [47]. Исключением был *Helicobacter* spp., который детектировали у животных на протяжении всего эксперимента.

Для эксперимента использовали мышей *Muc2*^{-/-} инбредного скрещивания, которые поступили в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных, “SPF-виварий”» ИЦиГ СО РАН из ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологий» РАН, г. Москва. В целях обеспечения максимально различимой микрофлоры между линиями и оценки её роли в развитии воспаления в качестве контроля использовали мышей линии C57BL/6, а не сибсов от гетерозиготного скрещивания.

Животные содержали однополыми группами по 3–5 особей в индивидуальных вентилируемых клетках («Optimice», США). Световой режим искусственный: 14 ч освещения и 10 ч темноты; температура — 20–22 °С; влажность — 36%; давление — 38 Па. Для подстилки использовали обеспыленную березовую стружку. Животные получали корм ssniff® R/M-N autoclavable V1534-3 («Ssniff», Германия) *ad libitum*. В качестве питьевой воды животным предоставляли стерильную деионизированную воду с добавлением минералов K⁺, Mg²⁺ («Северянка», Санкт-Петербург, Россия) *ad libitum*.

Антибактериальная терапия. В целях эксперимента группе животных обеих линий ($n = 10$) с питьевой водой добавляли три антибиотика: амоксицилин, метронидазол и кларитромицин. Расчёт антибиотиков в 1 мл воды был проведён из количества потребляемой воды одним животным в день (в среднем 4 мл):

- амоксициллин в концентрации 0,75 мг/мл, суточная доза для одного животного составила 3 мг;

- метронидазол в концентрации 0,25 мг/мл, суточная доза для одного животного составила 1 мг;
- кларитромицин в концентрации 0,25 мг/мл, суточная доза для одного животного составила 1 мг.

Соответствующей группе мышей (по 10 животных в каждой группе) в питьевую воду добавляли три антибиотика вместе с 0,1%-ной L-фукозой.

Концентрации антибиотиков и фукозы брали из ранее опубликованных работ [35, 44, 46, 48]. Расчёт дозы антибиотиков проводили согласно стандартной схемы лечения мышей *Helicobacter* spp. [49]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что такие дозы антибиотиков только при добавлении в корм наиболее эффективны в борьбе с хеликобактерной инфекцией [36, 50].

Гистологический анализ толстой кишки. Для гистологического анализа образцы проксимального отдела толстой кишки мышей длиной ~5 мм фиксировали в 10%-ном формалине, далее обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и последовательно проводили через бутанол и ксилол с последующим заключением в парафин. Далее выполняли срезы толщиной 3 мкм и окрашивали с помощью двух окрашиваний: на ШИК-реакцию и гематоксилин-эозином («БиоВитрум», Россия). Перед окраской образцы помещали в толуол для удаления парафина, затем проводили по спиртам нисходящей концентрации и доводили до воды. Далее выполняли окрашивание, согласно инструкции производителя.

Анализ экспрессии генов в толстой кишке. Экспрессию генов в ткани толстой кишки оценивали по количеству мРНК соответствующего гена методом ПЦР в реальном времени. Образец ткани дистального отдела толстой кишки (~5 мм) гомогенизировали в 500 мкл TriReagent («Invitrogen», США), затем добавляли 100 мкл хлороформа и центрифугировали 10 мин, 12 000 g, 4 °С. Водную фазу, содержащую РНК, отбирали в чистую пробирку и осаждали изопропанолом (на льду в течение 10 мин), центрифугировали 15 мин, 12 000 g, 4 °С, а затем промывали 75%-ным этанолом. Образец высушивали и растворяли РНК в ультрачистой деионизированной воде (Milli-Q). Затем образцы РНК обрабатывали ДНКазой I («Thermo Scientific», США), согласно рекомендациям производителя. Обработанную РНК осаждали 96%-ным этанолом при 20 °С в течение 2 ч, а затем центрифугировали (15 мин, 12 000 g, 4 °С), далее промывали 70%-ным этанолом, высушивали от спирта и растворяли в воде Milli-Q. Кон-

центрацию РНК в образцах определяли при помощи NanoDrop 2000 («Thermo Scientific»).

кДНК получали путём проведения реакции обратной транскрипции с матрицы РНК, реакцию проводили с обратной транскриптазой MuLV («СибЭнзим», Россия), согласно рекомендациям производителя. Смесь РНК (3–7 мкг), праймерных олигонуклеотидов (oligo dT и Random, 600 нг каждого) («БИОС-СЕТ», Россия) и нуклеотидов (концентрация 1 mM каждого) нагревали до 65 °С в течение 5 мин и охлаждали в течение 5 мин на льду. Затем в реакционную смесь добавляли обратную транскриптазу (100 Ед.а.) и реакционный буфер. Реакцию проводили при 37 °С в течение часа, а затем инактивировали фермент нагреванием до 70 °С в течение 5 мин. Полученные образцы кДНК хранили при –20 °С.

Количество мРНК генов оценивали по количеству кДНК в образце при помощи количественной ПЦР в реальном времени. Последовательности праймерных олигонуклеотидов подбирали самостоятельно (табл. 1).

Правильность полученного продукта оценивали по длине бэнда полученного продукта методом электрофореза в агарозном геле. Реакционная смесь (20 мкл) содержала БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue 1x («БиоЛабМикс», Россия), соответствующие праймеры (0,3 мкМ каждого) и 40–200 нг кДНК. ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System («BioRad Laboratories», США). ДНК денатурировали 5 мин при 95 °С; далее 40 циклов: денатурация – 95 °С, 15 с; отжиг праймеров – 62 °С, 25 с; элонгация – 72 °С, 25 с. Каждый эксперимент повторяли 3 раза и в качестве результата брали среднее значение по трём показателям. Не было ни одного случая повтора, который отличался от двух других более чем на 5%. Количество мРНК целевого гена нормировали на количество мРНК гена бета-тубулина (Tubb) по формуле: 2^{-Ct} (Ct целевого гена – Ct гена Tubb), где Ct – цикл, соответствующий пороговому уровню светимости продукта ПЦР.

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%-ного этанола, затем перемешивали 5 мин и центрифугировали 10 мин при 3000 g и 4 °С. 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 ещё 1 мл 96%-ного этанола, и после повторения описан-

ной выше процедуры удаляли супернатант, чтобы избавиться от следовых остатков свободной фукозы. Затем помещали пробирку с тканью на лёд 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 (концентрированная $H_2SO_4 : H_2O = 6 : 1$), охлаждённого до 0 °С. Далее содержимое пробирок перемешивали и инкубировали в термостате при температуре 100 °С в течение 5 мин, а затем охлаждали под проточной водой. Ко всем пробам, кроме тех, которые служили для определения фона, добавляли по 10 мкл 3%-ного гидрохлорид L-цистина (CysHCl) и инкубировали 90 мин при комнатной температуре. Далее определяли поглощение при 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 [51], и выражали как мкг фукозы на мг белка.

Определение концентрации цитокинов в крови методом мультиплексного анализа. Для измерения уровня цитокинов 200 мкл образца крови ($n = 6$ – для контроля, $n = 3$ – для *Muc2^{-/-}*) центрифугировали при 3 000 g в течение 15 мин при 4 °С, затем отбирали в чистую пробирку по 150 мкл сыворотки. Концентрацию цитокинов в сыворотке измеряли с помощью 6-плексной панели MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine Magnetic Bead Panel («Merck», Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Детекцию проводили с помощью системы Luminex 200 («Merck»), используя программное обеспечение xPONENT 3.1. Концентрацию цитокинов (IL-1a, IL-17, IL-12p40, IL-12p70, IL-22, INF-gamma) представляли как пг цитокина в мл крови.

Определение бактериальной ДНК в фекалиях и ткани толстой кишки методом количественной ПЦР в реальном времени. Количество бактерий в фекалиях оценивали по количеству бактериальной ДНК гена 16S рибосомной РНК (рРНК), нормированному на ДНК гена 28S рРНК *Mus musculus*. ДНК-консервативный участок гена 16S рРНК, а также *Helicobacter* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp. определяли при помощи праймеров к участку гена 16S рРНК соответствующей группы бактерий. Для определения общего количества бактерий использовали

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, используемых для определения уровня экспрессии генов мРНК

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Мишень
Tnf-F Tnf-R	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT GGCACCCTAGTTGGTTGTCTTT	мРНК <i>Tnf</i> (кДНК)
Il1b-F Il1b-R	AAGGAGAACCAAGCAACGACAA AACTCTGCAGACTCAAACCTCCA	мРНК <i>Il1b</i> (кДНК)
Il6-F Il6-R	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA	мРНК <i>Il6</i> (кДНК)
Rorc-F Rorc-R	ACTACGGGGTTATCACCTGT GTGCAGGAGTAGGCCACATT	мРНК <i>Rorc</i> (кДНК)
Foxp3-F Foxp3-R	AGGAGACATCCATCAGGGCT TGCTGCTTTAGGTGGAGTGG	мРНК <i>Foxp3</i> (кДНК)
Il1a-F Il1a-R	CCCGTCCTTAAAGCTGTCTG AATTGGAATCCAGGGGAAAC	мРНК <i>Il1a</i> (кДНК)
Tubb5-F Tubb5-R	TGAAGCCACAGGTGGCAAGTAT CCAGACTGACCGAAAACGAAGT	мРНК <i>Tubb5</i> (кДНК)
Tbet-F Tbet-R	CCAGGGAACCGCTTATATG CGATCATCTGGGTACATTGT	мРНК <i>Tbx21</i> (кДНК)

праймеры к консервативному участку бактериального гена 16S рРНК. Количество ДНК гена 28S рРНК *M. musculus* определяли при помощи праймерных олигонуклеотидов («БИОС-СЕТ»), которые подбирали самостоятельно (табл. 2).

Все праймерные последовательности подбирали при помощи программ Primer-BLAST [52] и Unipro UGENE [53]. Реакционная смесь (20 мкл) содержала БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue 1x («БиоЛабМикс»), соответствующие праймеры (300 нМ каждого) и ДНК, выделенную из фекалий. ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System. ДНК денатурировали 5 мин при температуре 95 °С; далее проводили 40 циклов: денатурация – 95 °С, 15 с; отжиг праймеров – 62 °С, 25 с; элонгация – 72 °С, 25 с.

Нормирование бактериальной ДНК на ДНК мыши (*M. musculus*) выполняли по формуле: 2^{-Ct} (Ct гена 28S рРНК *M. musculus* – Ct гена 16S рРНК *Bacteria*), для специфических бакте-

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидов, используемых для определения количества ДНК бактерий

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Мишень
Mus28S-F Mus28S-R	CCTGGCGCTAAACCATTCGT AAAGCCCGCAGAGACAAACC	28S pRNA <i>M. musculus</i>
16S-F 16S-R	TCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	16S pRNA <i>Bacteria</i>
Bac.spp-F Bac.spp-R	GAGAGGAAGGTCCCCAC CGTACTTGGCTGGTTCAG	16S pRNA <i>Bacteroides</i> spp.
Lac.spp-F Lac.spp-R	ATCTTCCACAATGGRGCG GGCTGCTGGCACGTAGTTAG	16S pRNA <i>Lactobacillus</i> spp.
Hel.spp-F Hel.spp-R	CGGAGGGTGCAAGCGTACT ATTCCACCTGCCTCTCCAC	16S pRNA <i>Helicobacter</i> spp.
E. coli-F E. coli-R	GGCAGGCCTAACACATGCAA CCCCTCTTTGGTCTTGCGAC	16S pRNA <i>Escherichia coli</i>
Staphyl-F Staphyl-R	ATGCAAGTCGAGCGAACG(A)GA TGTCTCAGTTCCAGTGTGGC	16S pRNA <i>Staphylococcus</i> spp.
Str.spp-F Str.spp-R	GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC ACGTTCGATTCATCACGTTG	16S pRNA <i>Streptococcus</i> spp.
CCOC-F CCOC-R	GACGCCGCGTGAAGGA AGCCCCAGCCTTTCACATC	16S pRNA <i>Blautia</i> spp.

рий – по формуле: $2^{\Delta C_t}$ (Ct гена 16S рНК *Bacteria* – Ct гена 16S рНК специфическая для определенного сообщества бактерий), где Ct – цикл, соответствующий пороговому уровню светимости продукта ПЦР. Уровень бактериальной ДНК у мышей дикого типа C57BL/6 и у мышей *Muc2^{-/-}* выражали в условных единицах.

Определение разнообразия бактериального состава. Разнообразие бактериальной микрофлоры определяли методом одноцепочечного конформационного полиморфизма (Single-strand conformation polymorphism, SSCP) гена 16S рНК, за основу брали методику, предло-

женную Schwieger и Tebbe [54] в 1998 г. Выделенную из фекалий ДНК объединяли по группам и проводили ПЦР, используя рекомбинантную ДНК-полимеразу Phusion High-Fidelity DNA Polymerase («Thermo Scientific») и праймеры («БИОССЕТ»), комплементарные вариабельному региону 4 (V4) гена 16S рНК, обратный праймер был фосфорилирован на 5'-конце (табл. 3).

В реакционную смесь (High-Fidelity-буфер для полимеразы; 3% диметилсульфоксида; 200 мкМ нуклеотиды; 1 мкМ праймеры; ДНК-полимераза) добавляли 25 нг ДНК (общий объ-

Таблица 3. Последовательность олигонуклеотидов, используемых в методе SSCP

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Краткое обозначение	Источник
Com-F Com-R	CAGCAGCCGCGGTAATAC P-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	V4 16S pRNA <i>Bacteria</i>	[54]

ём реакции 50 мкл). Реакцию проводили в амплификаторе T100TM Thermal Cycler («BioRad Laboratories»). ДНК денатурировали при 98 °С 3 мин; затем проводили 35 циклов: денатурация – 98 °С, 15 с; отжиг праймеров – 50 °С, 20 с; элонгация – 72 °С, 20 с. Наличие продукта ПЦР проверяли при помощи электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Электрофорез проводили в 0,5-кратном Tris-боратном буфере (44,5 мМ Tris; 44,5 мМ борная кислота; 1 мМ ЭДТА; pH 8) в течение 40 мин при напряжении 130 В. Продукты ПЦР вычищали из реакционной смеси с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit («Thermo Scientific»), согласно протоколу производителя. С очищенной пробой ставили реакцию с экзонуклеазой фага лямбда (Lambda Exonuclease, «Thermo Scientific»), согласно рекомендациям производителя. Данный фермент обладает экзонуклеазой активностью по отношению к двуцепочечным ДНК при наличии в них фосфатных групп на 5'-конце, с его помощью получали одноцепочечные ДНК. Полученные ДНК (10 мкл) денатурировали 5 мин при температуре 95 °С в 15 мкл денатурирующего буфера (95%-ный формамид; 10 мМ КОН) и охлаждали реакционную смесь на льду. К полученным образцам добавляли краску (0,1% бромфенолового синего; 0,1% ксиленианола) в соотношении 1/100, наносили ДНК на 12%-ный полиакриламидный гель и проводили электрофорез в 1-кратном Tris-боратном буфере (89 мМ Tris; 89 мМ борная кислота; 2 мМ ЭДТА; pH 8) в течение 20 ч при напряжении 220 В. После электрофореза гель красили серебром [55]. Гель промывали ультрачистой деионизированной водой (Milli-Q) и фиксировали 20 мин в 10%-ном растворе уксусной кислоты. Затем отмывали гель от кислоты водой Milli-Q 3 раза по 2 мин и оставляли в растворе серебра (0,1% AgNO₃, 0,15%-ный параформальдегид) на 30 мин. Раствор серебра удаляли и промывали гель водой Milli-Q 20 с. Гель проявляли холодным проявочным раствором (3% Na₂CO₃; 0,3% параформальдегида; 0,0002% Na₂S₂O₃), после проявки окрашивание останавливали холодным 10%-ным раствором уксусной кислоты. Гель фотографировали при помощи гель-документирующей системы Gel DocTM XR+ System («Bio Rad», США).

Получение лимфоцитов из мезентериальных лимфатических узлов. Мезентериальные лимфатические узлы вырезали из брыжейки и помещали в пробирку на 1,5 мл, содержащую 500 мкл натрий-фосфатного буфера (1,8 мМ KH₂PO₄, 10 мМ Na₂HPO₄, 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl; pH 7,4), далее пробирку держали на льду. Гомо-

генизировали лимфатические узлы при помощи пестикового ручного гомогенизатора («Sovtech», Россия), затем фильтровали суспензию через фильтр для клеток с диаметром пор 70 мкм («BD Falcon», США), объём суспензии клеток доводили до 1 мл натрий-фосфатным буфером, отбирали 50 мкл для подсчёта количества клеток в камере Горяева. Далее промывали суспензию 2 раза 2%-ным бычьим сывороточным альбумином (БСА) в том же натрий-фосфатном буфере и затем центрифугировали при 1500 g, 7 мин при 4 °С. Разбавляли лимфоциты буфером для окрашивания (1% БСА, 0,1% NaN₃ в натрий-фосфатном буфере).

Определение количества CD25⁺Foxp3⁺CD4⁺ клеток методом проточной цитометрии. Полученную суспензию клеток разбавляли натрий-фосфатным буфером (1,8 мМ KH₂PO₄, 10 мМ Na₂HPO₄, 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl; pH 7,4) до концентрации 3000–5000 клеток/мкл и проводили окрашивание клеток. Для этого 250 мкл суспензии инкубировали с антителами PE/Cy7-anti-CD4 и APC-anti-CD25 («BioLegend», США) 60 мин при +4 °С. Затем образцы фиксировали при помощи однократного реактива True-Nuclear™ Fix («BioLegend») 50 мин в темноте при комнатной температуре. Далее пермобилизовали клеточную мембрану при помощи однократного True-Nuclear™ Perm Buffer («BioLegend»), центрифугировали 10 мин при 2100 g и 20 °С. Затем разбавляли клетки 100 мкл буфера для пермобилизации True-Nuclear™ Perm («BioLegend») и инкубировали с антителами AlexaFluor488-anti-Foxp3 («BioLegend») 90 мин в темноте при комнатной температуре. Затем образцы промывали буфером для пермобилизации True-Nuclear™ Perm и буфером для окрашивания. После промывки клетки разбавляли буфером для окрашивания до концентрации 1500–3000 клеток/мкл и хранили в темноте при температуре 4 °С до анализа (1–2 дня). Анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8HT Flow Cytometer («Merck»), в каждом образце анализировали 50 000 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.

Биохимический анализ крови. Биохимический анализ крови проводили на анализаторе Dimension RxL Max («Dade Bexring Inc.», США). Использовали картриджи с реагентами для определения креатинина, креатинкиназы, аланин-

аминотрансферазы (АЛТ), аспаратамино-трансферазы (АСТ) (Dimension Clinical Kit, «Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.», США).

Статистическая обработка. Все данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программного обеспечения IBM®SPSS®Statistic (версия 23). Для анализа выборок, не описывающихся нормальным распределением, использовали непараметрические методы статистической обработки. Сравнение между двумя группами для выборок с нормальным распределением проводили при помощи *t*-критерия Стьюдента, а для выборок при отсутствии нормального распределения – при помощи критерия Манна–Уитни.

Для сравнения групп, в которых детектировался или нет признак, использовали точный тест Фишера. Обработку данных по биохимическим показателям проводили методом MANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Мыши *Muc2*^{-/-} являются наиболее подходящей моделью для изучения ВЗК, поскольку нарушение синтеза муцина 2 связано с сокращением количества бокаловидных клеток у людей, которые страдают ЯК [56]. В данной работе у мышей линии C57BL/6 наблюдали ярко-розовые гранулы с гликопротеинами (ШИК-реакция) в бокаловидных клетках толстой кишки,

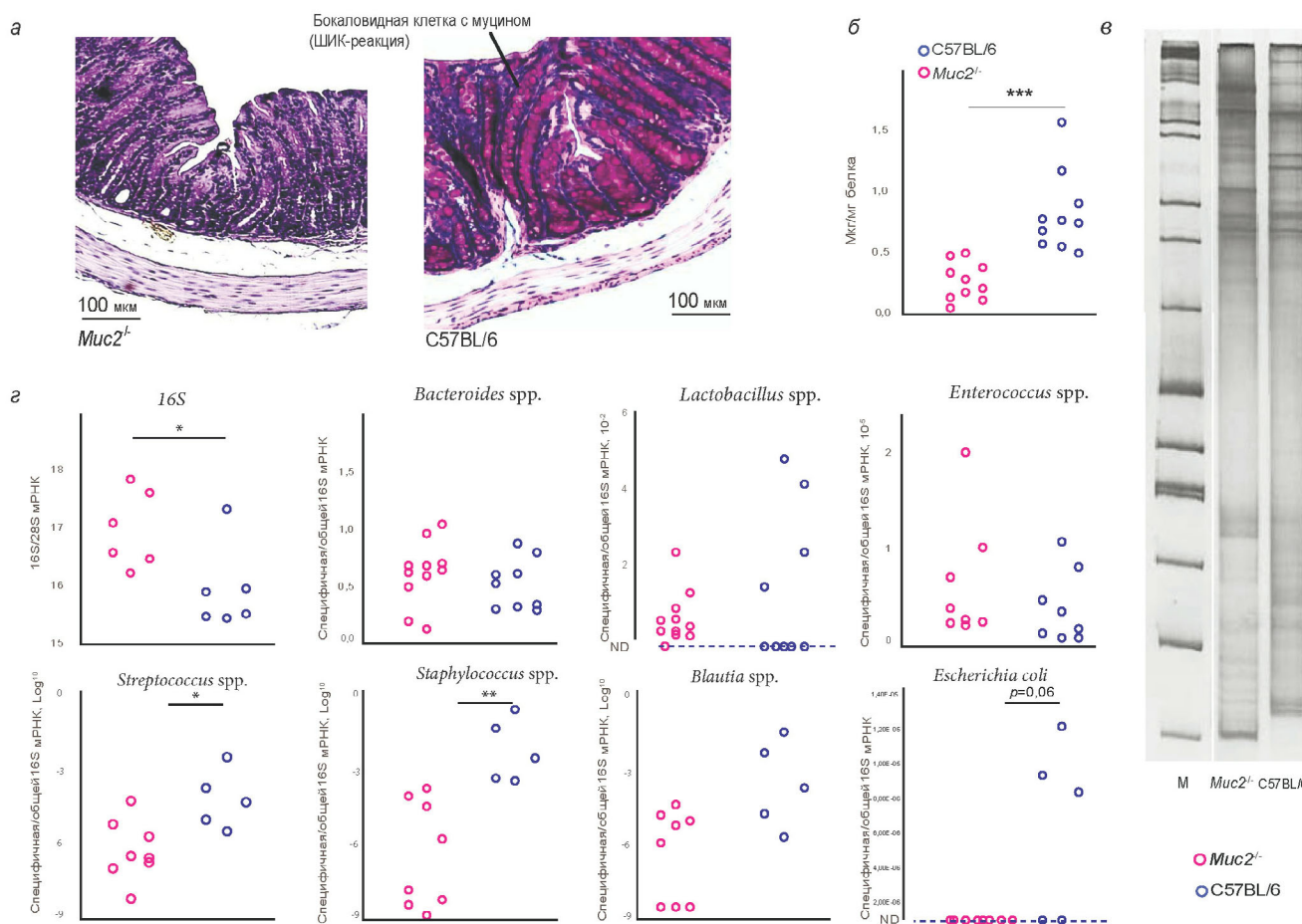


Рис. 1. Муцины на гистологических срезах толстой кишки и концентрация фукозы в толстой кишке, качественный и количественный бактериальный состав фекалий мышей *Muc2*^{-/-} и дикого типа C57BL/6. *a* – Гистологический срез толстой кишки (проксимальный отдел) мышей *Muc2*^{-/-} и дикого типа C57BL/6. Стрелка указывает на бокаловидную клетку с окрашенным (ШИК-реакция) муцином. *б* – Фукоза, связанная с белком в ткани толстой кишки мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 10$) и дикого типа C57BL/6 ($n = 10$). *в* – Качественный состав кишечной микрофлоры у мышей *Muc2*^{-/-} и дикого типа C57BL/6, оценённый методом одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) варибельного (V4) участка 16s рНК. *г* – Количество бактериальной ДНК (16S рНК *Bacteria*, $n = 12$; *Bacteroides* spp., $n = 20$; *Enterococcus* spp., $n = 20$; *Lactobacillus* spp., $n = 20$; *Streptococcus* spp., $n = 13$; *Staphylococcus* spp., $n = 13$; *Blautia* spp., $n = 13$; *E. coli*, $n = 13$) в фекалиях у мышей *Muc2*^{-/-} и дикого типа C57BL/6. *** $p < 0,001$, *t*-тест Стьюдента. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – Манн–Уитни *u*-тест. $p = 0,06$ точный тест Фишера. ND – ниже порога чувствительности метода детекции

тогда как у мышей линии *Muc2^{-/-}* гранулы с гликопротеинами отсутствовали (рис. 1, *a*). Известно, что муцин 2 – основной гликопротеин, который вырабатывают бокаловидные клетки как толстой, так и тонкой кишок [57]. Именно поэтому у мышей *Muc2^{-/-}* отсутствуют гранулы с муцином 2 в бокаловидных клетках.

Также известно, что у людей с БК нарушается фукозилирование муцина 2, т.е. процесс прикрепления терминального моносахарида фукозы [58]. На рис. 1, *б* мы наблюдали снижение количества связанной с белком фукозы у мышей линии *Muc2^{-/-}* по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6. Надо отметить, что у мышей, используемых в экспериментах, присутствовала инфекция *Helicobacter* spp. Известно, что она способна провоцировать колит у мышей *IL10^{-/-}* [15].

Мы предположили, что подобный дефицит связанной фукозы может приводить к снижению фукозилированных протеогликанов в просвете толстой кишки. А фукоза в составе гликанов может отщепляться фукозидазами бактерий [59]. Тем самым отсутствие фукозы в составе гликанов или отсутствие самих гликанов может влиять на разнообразие кишечных симбиотических бактерий, так как фукоза является для многих бактерий фактором вирулентности и источником энергии [41]. Действительно, у мышей *Muc2^{-/-}* обнаружили качественные изменения состава кишечной микрофлоры по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6, которые оценивали методом одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) варибельного (V4) участка 16s рРНК (рис. 1, *в*). Одна дорожка на рис. 1, *в* – это определенный штамм бактерий.

Количественный анализ отдельных видов бактерий, который был оценён методом ПЦР в реальном времени, показал изменение количества ДНК 16S рРНК *Bacteria* (Манн-Уитни *u*-тест: $Z = 2,24$, $p > 0,05$) и некоторых семейств бактерий между линиями мышей. Мыши *Muc2^{-/-}* с инфекцией *Helicobacter* spp. не отличались от мышей дикого типа C57BL/6 по количеству ДНК 16S рРНК *Bacteroides* spp. ($Z = 0,95$, $p > 0,05$), *Enterococcus* spp. ($Z = 1,05$, $p > 0,05$), *Lactobacillus* spp. ($Z = 0,57$, $p > 0,05$), *Blautia* spp. ($Z = 1,54$, $p > 0,05$). Однако представители семейств *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. и *E. coli* были достоверно ниже у мышей *Muc2^{-/-}* по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 ($Z = 2,2$, $p > 0,05$; $Z = 2,8$, $p < 0,01$ и точный тест Фишера – $p = 0,06$; рис. 1, *г*). Схожесть по некоторым таксономическим группам, возможно, связана с тем, что животные проходили этап совместного содер-

жания в процессе выполнения возвратного скрещивания мышей *Muc2^{-/-}* на дикий тип C57BL/6, и дальнейшее получение животных через гетерозиготное скрещивание родителей *Muc2^{+/-}*. Но все же некоторые бактериальные сообщества кишечника мышей *Muc2^{-/-}* отличались от мышей дикого типа C57BL/6, что, скорее всего, обусловлено отсутствием муцина 2 в просвете кишки.

Истончение муцинового слоя кишечника, основным компонентом которого является муцин 2, приводит к снижению фукозы в кишечнике и, как следствие, к качественным изменениям кишечного микробиома [36, 45, 46]. Как известно, из-за постоянного взаимодействия кишечной микрофлоры и иммунных клеток кишечника отсутствие муцина 2 в сочетании с изменением состава бактериальных представителей, особенно в присутствии инфекции *Helicobacter* spp., должны вызывать воспалительные реакции. Однако на гистологических срезах у мышей *Muc2^{-/-}* не было выявлено признаков острой воспалительной реакции: инфильтрация нейтрофилов, отёк и разрушение крипт (рис. 2, *a*). Ранее было показано, что на химически-индуцированной модели ВЗК признаки острого воспаления ярко выражены в виде отёка, разрушения крипт и инфильтратов иммунных клеток [43]. На гистологических срезах проксимального отдела толстой кишки у мышей *Muc2^{-/-}* было выявлено только удлинение крипт более чем в 2 раза по сравнению с мышами линии C57BL/6 (рис. 2, *a*). Количество клеток в крипте достоверно больше у мышей линии *Muc2^{-/-}* по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 (рис. 2, *б*). Применение антибиотиков и в сочетании с фукозой не повлияло на высоту крипт (рис. 2, *в* и *д*), так, различий по количеству клеток в пределах одного генотипа не наблюдалось, а разница количества клеток в крипте между мышами *Muc2^{-/-}* и C57BL/6 сохранилась такой же, как и у нативных животных (рис. 2, *г* и *е*). Удлинение крипт не было связано и с наличием инфекции *Helicobacter* spp., так как в другом исследовании также было показано удлинение крипт у мышей *Muc2^{-/-}*, которые не имели *Helicobacter* spp. [43]. Мы предполагаем, что в связи с отсутствием кишечного гликопротеина, эпителиальные клетки и микроорганизмы тесно взаимодействуют, а удлинение крипт может иметь адаптивный характер и обеспечивать более эффективное выведение бактерий из просвета кишечника вместо подвижного жидкого слоя муцина.

Анализ уровня экспрессии генов в восходящем отделе ткани толстой кишки показал увеличение количества мРНК генов провоспалительных

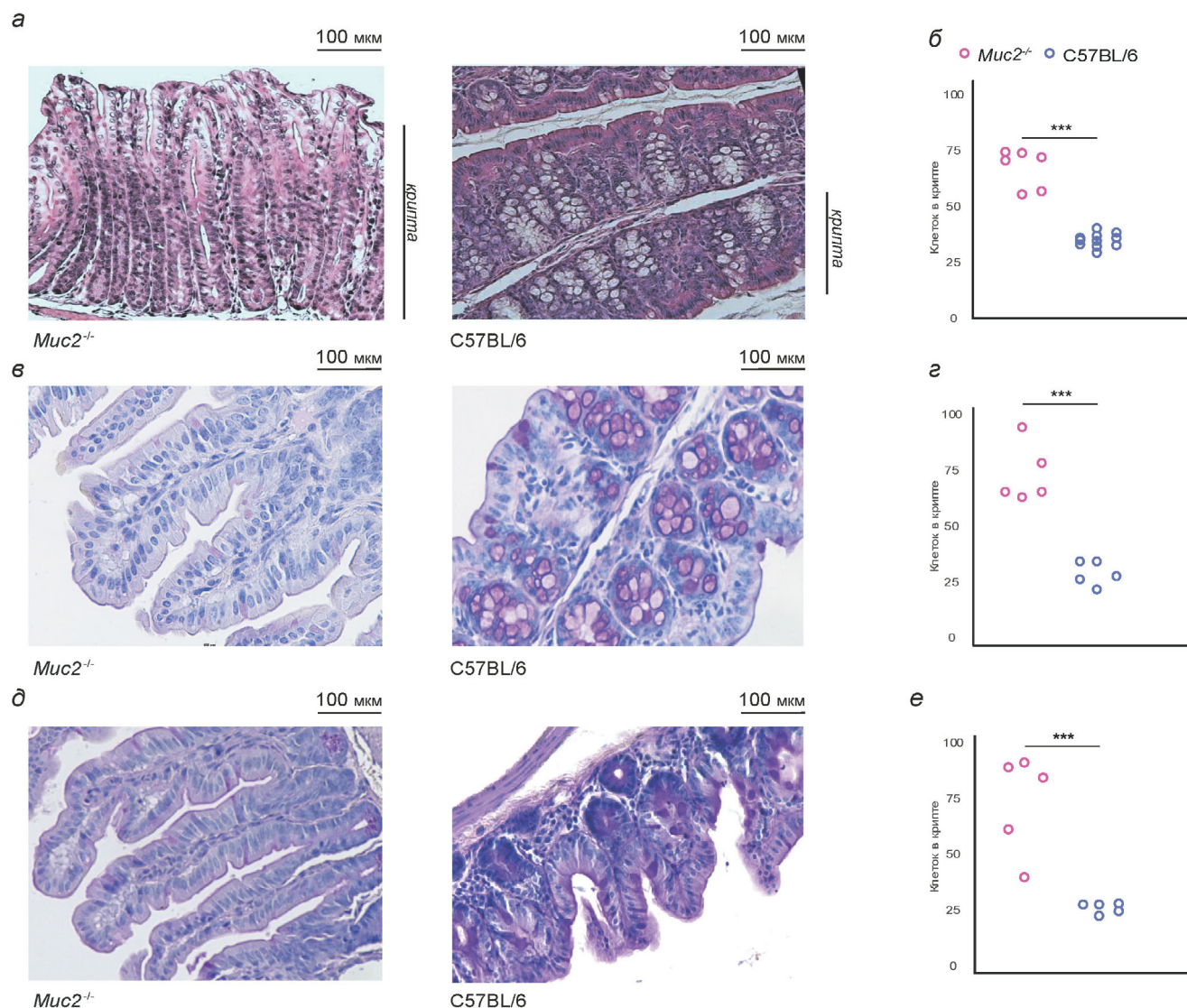


Рис. 2. Высота крипт на гистологических срезах толстой кишки интактных мышей *Muc2*^{-/-} и дикого типа C57BL/6 до и после применения антибиотиков или антибиотиков в сочетании с фукозой. *а* – Гистологический срез толстой кишки (проксимальный отдел) мышей, сравнение высоты крипт между мышами *Muc2*^{-/-} и диким типом C57BL/6. Окраска гематоксилин-эозином. *б* – Количество клеток в крипте проксимального отдела толстой кишки мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 6$) и C57BL/6 ($n = 11$). *в* – Гистологический срез толстой кишки (проксимальный отдел) мышей *Muc2*^{-/-} и дикого типа C57BL/6 после применения антибиотиков. Окраска – ШИК-реакция. *г* – Количество клеток в крипте проксимального отдела толстой кишки мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 5$) и C57BL/6 ($n = 5$) после применения антибиотиков. *д* – Гистологический срез толстой кишки (проксимальный отдел) мышей *Muc2*^{-/-} и дикого типа C57BL/6 после применения антибиотиков в сочетании с фукозой. Окраска – ШИК-реакция. *е* – Количество клеток в крипте проксимального отдела толстой кишки мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 5$) и C57BL/6 ($n = 5$) после применения антибиотиков в сочетании с фукозой. *** $p < 0,001$, t -тест Стьюдента

тельных цитокинов. Количество мРНК генов *Tnf* и *Ila* было значительно выше у мышей *Muc2*^{-/-} по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 (рис. 2, *в*). Уровень мРНК генов *Il1b* и *Il6* не отличался между мышами *Muc2*^{-/-} и диким типом C57BL/6 ($t = 1,8$, $p > 0,05$; рис. 3, *а*). Уровень экспрессии белка IL-1a в ткани толстой кишки тоже демонстрирует повышение у мышей *Muc2*^{-/-} по сравнению с

диким типом C57BL/6 ($Z = 2,1$, $p < 0,05$). Количество IFN- γ в ткани толстой кишки не отличалось между мышами *Muc2*^{-/-} и диким типом C57BL/6 ($Z = 1,3$, $p > 0,05$; рис. 3, *б*).

Известно, что в ответ на длительное воспаление организм запускает противовоспалительный ответ с помощью активации Т-регуляторных клеток [33, 60]. В связи с этим определение экспрессии различных транскрипционных фак-

торов, запускающих активацию Т-клеток по разным путям, поможет понять, какие пулы Т-клеток преобладают в ткани толстой кишки мышей *Muc2*^{-/-}. Количество мРНК гена транскрипционного фактора Т-регуляторных клеток (*Foxp3*) было достоверно выше у мышей *Muc2*^{-/-} по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 (рис. 3, в). Подобный эффект был показан нами ранее на клетках, участниках Т-регуляторного иммунного ответа. В мезентериальных лимфатических узлах количество CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-клеток было выше у мышей *Muc2*^{-/-} по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 при наличии *Helicobacter* spp. [41]. Уровень мРНК генов транскрипционных факторов Th1-клеток (*Tbx21*) и Th17-клеток (*Rorc*) не отличался между мышами *Muc2*^{-/-} и C57BL/6 ($t = 0,9, p > 0,05$ и $t = 1,1, p > 0,05$ соответственно; рис. 3, в). Также не было различий между генотипами мышей по уровню цитокинов IL-22 ($Z = 0,8, p > 0,05$), IL-17 ($Z = 0,5, p > 0,05$), IL-12p40 ($Z = 1,8, p > 0,05$), IL-12p70 ($Z = 1,5, p > 0,05$), которые участвуют в развитии Th1- и Th17-иммунных ответов.

По всей видимости, запуск не только воспалительных, но и регуляторных механизмов обеспечивают стабильность гомеостаза иммунитета в толстой кишке у мышей *Muc2*^{-/-}. В более ранних наших работах мы показали, что в региональных лимфатических узлах количество

Т-регуляторных клеток действительно становится больше у мышей линии *Muc2*^{-/-}, но только в случае присутствия инфекции *Helicobacter* spp. [44]. В ряде работ показано, что бактерии рода *Helicobacter* могут запускать толерантный ответ, чтобы обеспечить себе благоприятную среду для развития [17, 36, 44], но требуются дополнительные исследования, чтобы понять роль хеликобактерной инфекции в этом феномене.

Для уменьшения бактериальной нагрузки и воспаления у пациентов с ВЗК часто применяют антибактериальную терапию. Было показано, что антибиотики для лечения *Helicobacter* spp. у мышей *Muc2*^{-/-} были не только малоэффективными, но и также приводили к гибели животного из-за сопутствующего разрастания протозойной инфекции [49]. Но антибиотики влияют на представленность бактерий в кишечнике. Применение антибиотиков широкого спектра снижало количество ДНК 16S рРНК *Bacteria* как у мышей *Muc2*^{-/-} (с $3298,7 \pm 3427,7$ до $12,5 \pm 4,7$; $Z = 2,2$; $p < 0,05$; $n = 6$), так и у C57BL/6 (с $2567,8 \pm 719,7$ до $44,8 \pm 81,3$; $Z = 2,8$; $p < 0,01$; $n = 11$). На фоне этого применение антибиотиков у мышей *Muc2*^{-/-} и C57BL/6 вызывало более чем в 2 раза снижение связанной с белком фукозы в толстой кишке (рис. 4, а). Такое снижение фукозы может быть связано с уменьшением количества бактерий, так как фукозидазы бакте-

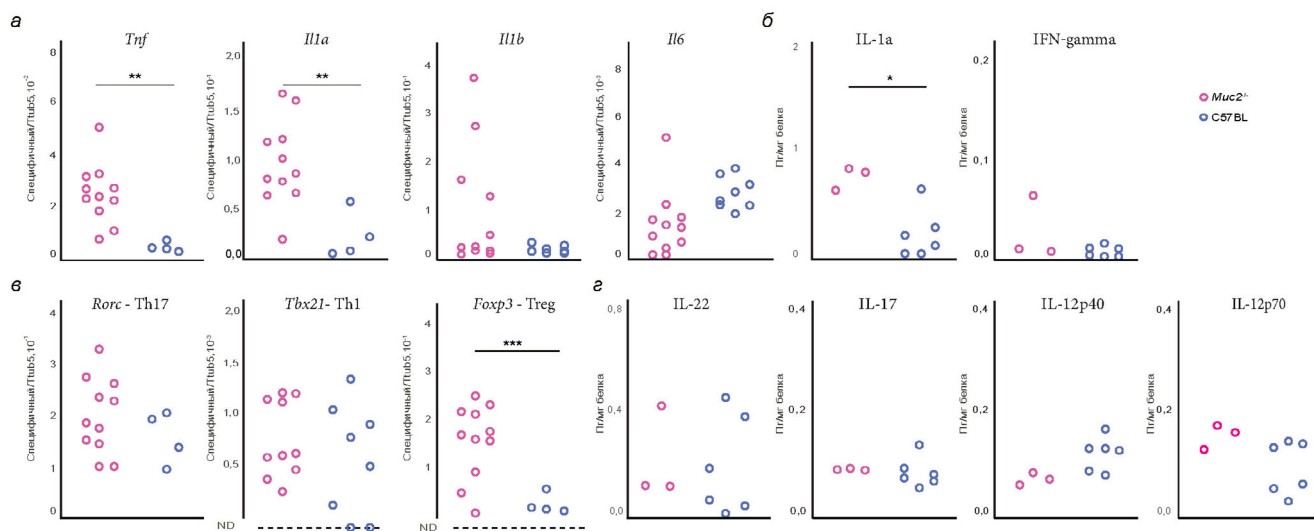


Рис. 3. Провоспалительные цитокины и транскрипционные факторы в толстой кишке мышей *Muc2*^{-/-} и дикого типа C57BL/6. а – Количество мРНК генов провоспалительных цитокинов (*Tnf*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6*) в восходящем отделе ткани толстой кишки у мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 11$) и C57BL/6 ($n = 4$). б – Количество белка провоспалительных цитокинов (IL-1a, IFN-gamma) в ткани восходящего отдела толстой кишки у мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 3$) и C57BL/6 ($n = 6$). в – Количество мРНК генов в восходящем отделе транскрипционных факторов Т-клеток (*Foxp3* – Th17, *Tbx21* – Th1) в ткани толстой кишки у мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 11$) и C57BL/6 ($n = 4-8$). г – Количество белка цитокинов (IL-22, IL-17, IL-12p40, IL-12p70), участников Th1- и Th17-ответа в ткани восходящего отдела толстой кишки у мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 3$) и C57BL/6 ($n = 6$). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ – t -тест Стьюдента. * $p < 0,05$ – Манн-Уитни u -тест. ND – ниже порога чувствительности метода детекции

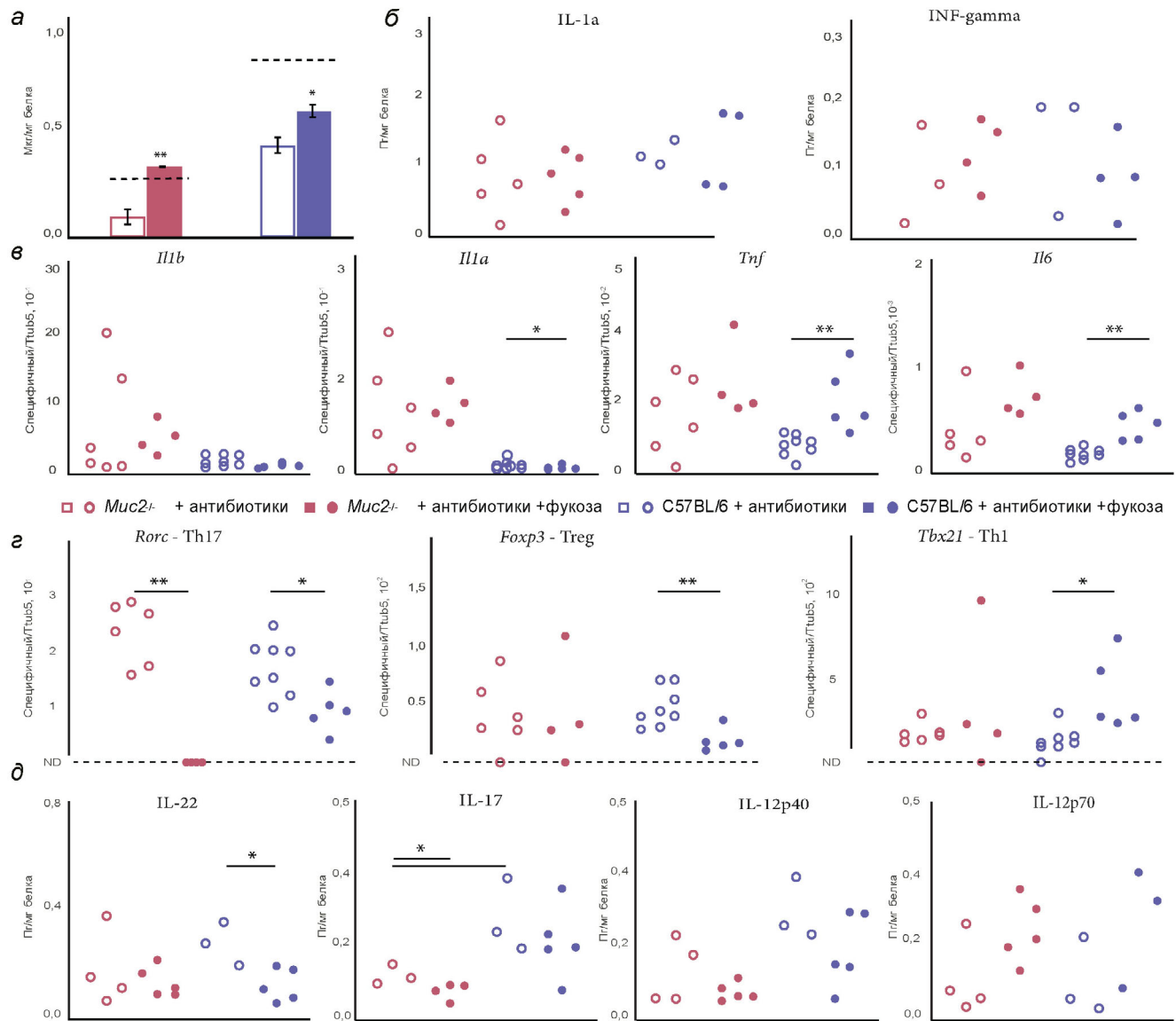


Рис. 4. Фукоза, провоспалительные цитокины и транскрипционные факторы в толстой кишке мышей *Muc2*^{-/-} и дикого типа C57BL/6 после применения антибиотиков или антибиотиков в сочетании с фукозой. *а* – Фукоза, связанная с белком в проксимальном отделе толстой кишки мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 7$) и C57BL/6 ($n = 10$) на фоне применения антибиотиков и антибиотиков в сочетании с фукозой. Пунктирная линия: базальный уровень фукозы у каждой линии мышей, не принимавших антибиотики. *б* – Количество белка провоспалительных цитокинов (IL-1a, INF-gamma) в восходящем отделе ткани толстой кишки у мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 10$) и C57BL/6 ($n = 8$) на фоне применения антибиотиков и антибиотиков в сочетании с фукозой. *в* – Количество мРНК генов провоспалительных цитокинов (*Il1b*, *Il1a*, *Tnf*, *Il6*) в восходящем отделе ткани толстой кишки у мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 10$) и C57BL/6 ($n = 13$) на фоне применения антибиотиков и антибиотиков в сочетании с фукозой. *г* – Количество транскрипционных факторов Т-клеток (*Foxp3* – Treg, *Rorc* – Th1, *Tbx21* – Th17) в восходящем отделе ткани толстой кишки у мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 10$) и C57BL/6 ($n = 13$) на фоне применения антибиотиков и антибиотиков в сочетании с фукозой. *д* – Количество белка цитокинов (IL-22, IL-17, IL-12p40, IL-12p70), участников Th1- и Th17-ответа в ткани восходящего отдела толстой кишки у мышей *Muc2*^{-/-} ($n = 10$) и C57BL/6 ($n = 8$) на фоне применения антибиотиков и антибиотиков в сочетании с фукозой. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *t*-тест Стьюдента. ND – ниже порога чувствительности метода детекции

рий могут отщеплять фукозу из гликанов как самих хозяев, так и клеточных стенок бактерий. Известно, что представители рода *Bacteroides* могут экспрессировать подобные ферменты [61]. В связи с этим мы решили оценить из-

менение количества представителей разных родов бактерий после применения антибиотиков. Нам не удалось детектировать ДНК *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. как у мышей *Muc2*^{-/-} (11 из 11 позитивных без анти-

биотиков к 6 из 6 негативных после терапии, точный критерий Фишера, $p < 0,001$), так и у дикого типа C57BL/6 на фоне приёма антибиотиков (9 из 9 позитивных без антибиотиков к 6 из 6 негативных после терапии, точный критерий Фишера, $p < 0,001$).

Известно, что у пациентов с ВЗК применение антибиотиков может уменьшать воспаление в силу снижения бактериальной нагрузки [19]. На фоне приёма антибиотиков у мышей *Muc2^{-/-}* не было достоверного изменения количества мРНК генов провоспалительных цитокинов *Tnf* (с $0,024 \pm 0,011$ до $0,019 \pm 0,009$; $Z = 0,9$; $p > 0,05$; $n = 16$), *Il1a* (с $0,097 \pm 0,04$ до $0,14 \pm 0,11$; $Z = 0,6$; $p > 0,05$; $n = 17$), *Il1b* (с $0,096 \pm 0,12$ до $0,07 \pm 0,08$; $Z = 0,4$; $p > 0,05$; $n = 17$) и *Il6* (с $0,002 \pm 0,001$ до $0,004 \pm 0,003$; $Z = 1,9$; $p > 0,05$; $n = 14$; рис. 3, б). Также не было эффекта от антибиотиков у мышей *Muc2^{-/-}* на количество белка провоспалительных цитокинов IL-1a (с $0,69 \pm 0,09$ до $0,94 \pm 0,52$; $Z = 0,7$; $p > 0,05$; $n = 8$) и INF-gamma (с $0,02 \pm 0,02$ до $0,07 \pm 0,06$; $Z = 1,5$; $p > 0,05$; $n = 8$). При этом у мышей линии C57BL/6 был эффект антибиотиков на уровень мРНК генов провоспалительных цитокинов. Количество мРНК гена *Tnf* возросло с $0,004 \pm 0,002$ до $0,008 \pm 0,009$; $Z = 2,1$ ($p < 0,05$; $n = 12$), а *Il6* снижалось в 3 раза с $0,003 \pm 0,0005$ до $0,001 \pm 0,0005$; $Z = 2,6$ ($p < 0,01$; $n = 12$). Экспрессия остальных генов не изменилась: *Il1a* (с $0,022 \pm 0,025$ до $0,018 \pm 0,009$; $Z = 0,3$; $p > 0,05$; $n = 12$) и *Il1b* (с $0,006 \pm 0,005$ до $0,016 \pm 0,008$; $Z = 1,9$; $p > 0,05$; $n = 12$). Количество провоспалительного цитокина IL-1a в ткани толстой у мышей линии C57BL/6 увеличилось в 5 раз на фоне применения антибиотиков (с $0,18 \pm 0,22$ до $1,23 \pm 0,16$; $Z = 2,3$; $p < 0,05$; $n = 9$), тогда как INF-gamma не изменился (с $0,004 \pm 0,004$ до $0,06 \pm 0,08$; $Z = 1,1$; $p > 0,05$; $n = 9$). Несмотря на применение антибиотиков разница между линиями сохранилась (рис. 4, в). Таким образом, при наличии *Helicobacter* spp. у мышей *Muc2^{-/-}* приём антибиотиков снижает количество бактерий основных таксономических групп, но не вызывает уменьшения провоспалительного ответа.

Известно, что для переключения воспаления на противовоспалительный ответ необходимо активировать T-регуляторные клетки. Действительно, уровень экспрессии гена *Foxp3* у мышей *Muc2^{-/-}* на фоне приёма антибиотиков драматически снижался с $0,17 \pm 0,06$ до $0,005 \pm 0,002$ ($Z = 3,1$; $p < 0,01$; $n = 15$). У мышей *Muc2^{-/-}*, получавших только антибиотики, количество CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-клеток достоверно снижалось (с $(171,0 \pm 86,9) \times 10^3$ до $(33,9 \pm 23,2) \times 10^3$; $Z = 3,18$; $p < 0,01$; $n = 15$). Таким образом, обед-

нение микрофлоры вызывало снижение T-регуляторных клеток в мезентериальных лимфатических узлах.

Транскрипционные факторы Th1- и Th17-ответа не изменились на фоне терапии антибиотиками у мышей *Muc2^{-/-}*: *Tbex* с $0,0008 \pm 0,0004$ до $0,0012 \pm 0,0006$ ($Z = 1,1$; $p > 0,05$; $n = 17$) и *Rorc* с $0,20 \pm 0,07$ до $0,17 \pm 0,05$ ($Z = 1,7$; $p > 0,05$; $n = 16$). Аналогично, у мышей *Muc2^{-/-}* не было эффекта антибиотиков на количество цитокинов IL-22 (с $0,35 \pm 0,36$ до $0,17 \pm 0,12$; $Z = 0,1$; $p > 0,05$; $n = 8$), IL-17 (с $0,08 \pm 0,001$ до $0,09 \pm 0,02$; $Z = 0,6$; $p > 0,05$; $n = 8$), IL-12p40 (с $0,06 \pm 0,01$ до $0,10 \pm 0,06$; $Z = 0,7$; $p > 0,05$; $n = 8$), IL-12p70 (с $0,12 \pm 0,02$ до $0,08 \pm 0,07$; $Z = 1,1$; $p > 0,05$; $n = 8$), которые участвуют в развитии Th17- и Th1-иммунных ответов. У мышей дикого типа C57BL/6 антибиотики привели не только к повышению экспрессии гена *Tnf* с $0,004 \pm 0,002$ до $0,008 \pm 0,003$ ($Z = 2,0$; $p < 0,05$; $n = 12$), но и к активации гена *Tbex21* (транскрипционного фактора Th1-клеток) с $0,00006 \pm 0,00007$ до $0,00082 \pm 0,00071$ ($Z = 2,7$; $p < 0,01$; $n = 11$). Остальные транскрипционные факторы не изменились на фоне терапии антибиотиками у C57BL/6 мышей, так же как и у мышей *Muc2^{-/-}*: *Foxp3* с $0,011 \pm 0,008$ до $0,005 \pm 0,002$ ($Z = 1,3$; $p > 0,05$; $n = 12$) и *Rorc* с $0,16 \pm 0,05$ до $0,17 \pm 0,05$ ($Z = 0,5$; $p > 0,05$; $n = 12$). Однако уровень IL-17, который вовлечён в Th17-ответ, вырос в 2 раза на фоне приёма антибиотиков (с $0,09 \pm 0,02$ до $0,21 \pm 0,08$; $Z = 2,3$; $p < 0,05$; $n = 9$). Антибиотики не повлияли на другие цитокины, участвующие в Th17- и Th1-иммунных ответах: IL-22 (с $0,18 \pm 0,18$ до $0,26 \pm 0,08$; $Z = 0,8$; $p > 0,05$; $n = 9$), IL-12p40 (с $0,09 \pm 0,03$ до $0,16 \pm 0,15$; $Z = 0,8$; $p > 0,05$; $n = 9$) и IL-12p70 (с $0,08 \pm 0,04$ до $0,06 \pm 0,08$; $Z = 0,8$; $p > 0,05$; $n = 9$). Антибиотики нивелировали различия между линиями мышей (рис 4, г). Таким образом, снижение экспрессии T-регуляторного фактора у мышей *Muc2^{-/-}* на фоне приёма антибиотиков не способно сдерживать воспаление в кишке даже при снижении бактериальной нагрузки.

Ранее был показан эффект добавления пищевой L-фукозы на активацию макрофагов, элиминацию протозойной инфекции и увеличение триптофан-производящих бактерий [42, 43, 49]. При терапии антибиотиками уровень фукозы снижался у мышей *Muc2^{-/-}*, а добавленная к антибиотикам L-фукоза восстанавливала уровень связанной фукозы до исходного уровня в толстой кишке как мышей *Muc2^{-/-}*, так и C57BL/6 (рис 4, а). Повышение уровня фукозы в кишке может быть ассоциировано с восстановлением бактериального сообщества. Анализ

качественного разнообразия бактерий в фекалиях мышей *Muc2^{-/-}* показал изменение при добавлении фукозы к антибиотикам по сравнению с монотерапией антибиотиками (рис. 5, а). И действительно, добавление фукозы к антибиотикам частично восстанавливало количество ДНК 16S рРНК *Bacteria* только у мышей *Muc2^{-/-}* (с $12,5 \pm 4,7$ до $81,6 \pm 61,6$; $Z = 2,2$; $p < 0,05$; $n = 6$), тогда как у C57BL/6 достоверного восстановления не было (с $44,6 \pm 81,2$ до $0,7 \pm 0,7$; $Z = 0,5$; $p > 0,05$; $n = 11$). Фукоза с антибиотиками частично восстанавливала только количество ДНК *Bacteroides* spp. у мышей *Muc2^{-/-}* (6 из 6 негативных на фоне антибиотикотерапии против 5 из 5 позитивных при добавлении фукозы, точный критерий Фишера, $p < 0,01$), чего не наблюдалось у мышей линии C57BL/6 (6 из 6 негативных на фоне антибиотикотерапии против 2 из 5 позитивных при добавлении фукозы, точный критерий Фишера, $p > 0,05$; рис. 5, б). Восстановленный добавлением фукозы уровень *Bacteroides* spp. не отличался от исходного (рис. 5, б). При этом *Enterococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. не восстанавливались даже частично у мышей обоих генотипов. Можно предположить, что фукоза в толстой кишке мышей *Muc2^{-/-}* является источником энергии в большей степени для бактерий рода *Bacteroides*, что обуславливает частичное восстановление их популяции на фоне приёма пищевой L-фукозы. Однако *Enterococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. не восстанавливались у обоих генотипов мышей, что даёт возможность предположить о более сложной метаболической роли фукозы для бактериального сообщества кишечника.

Так как интоксикация бактериальными паттернами и самими антибиотиками может приводить к нарушению биохимических показателей крови, были оценены ферменты в крови: аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), креатинин до и после применения антибиотиков и в сочетании с фукозой у мышей *Muc2^{-/-}*. MANOVA показала достоверный эффект группы только для АСТ (рис. 5, в). У мышей дикого типа C57BL/6 не наблюдали достоверных отличий между биохимическими показателями на фоне приёма антибиотиков и в сочетании с фукозой (рис. 5, г). Можно предположить, что применение антибиотиков не влияет на гомеостаз мышей дикого типа, поскольку у них присутствует естественный барьер в виде муцинов, и это препятствует интоксикации погибающими патогенами в кишечнике.

Антибиотики вызывали увеличение количества фермента АСТ в крови у мышей *Muc2^{-/-}*, что может быть связано с интоксикацией и из-

менением общего метаболизма в результате дисбиоза. Ранее у мышей *Muc2^{-/-}Kaiso^{y/-}* было показано, что лечение *Helicobacter* spp. антибиотиками приводило к гибели животных [35]. У мышей при отсутствии муцина 2 повышается проницаемость кишечника [36, 37], таким образом, бактериальные паттерны могут попадать в кровь и вызывать цитотоксичность, которая сопровождается увеличением АСТ и даже гибелью животных, как было показано ранее [36, 50]. Добавление L-фукозы к данной схеме приёма антибиотиков снижает концентрацию данного фермента в крови до нормы, что является признаком уменьшения количества негативного действия антибиотиков (рис. 5, в). Добавление фукозы полностью не восстанавливало уровень креатинина, в связи с чем можно предположить, что метаболизм *Muc2^{-/-}* не может восстановиться до исходного уровня (рис. 5, в).

Приём фукозы с антибиотиками восстанавливал связанную с белком фукозу в толстой кишке, частично поднимал количество ДНК *Bacteroides* spp. и нормализовал биохимические показатели у мышей *Muc2^{-/-}*, однако это не снижало уровень воспалительных факторов. Уменьшение экспрессии гена *Foxp3* также может усугубить состояние иммунной системы мышей *Muc2^{-/-}*. В связи с этим можно полагать, что восстановление микрофлоры при добавлении фукозы к антибиотикам может повлиять на уровень воспалительных цитокинов и транскрипционные факторы. У мышей *Muc2^{-/-}* фукоза не восстанавливала уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов (рис. 4, в). Не восстанавливала фукоза и количество провоспалительных цитокинов в ткани толстой кишки у мышей *Muc2^{-/-}* (рис. 4, б). Уровень мРНК генов транскрипционных факторов Th1 и Treg также не изменился под действием фукозы, кроме гена *Rorc* (Th17), который вообще переставал детектироваться (рис. 4, г). Несмотря на отсутствие действия фукозы на количество мРНК гена *Foxp3*, мы обнаружили, что при добавлении фукозы восстанавливается количество регуляторных Т-клеток в мезентериальных лимфатических узлах у мышей *Muc2^{-/-}* (с $(33,9 \pm 23,2) \times 10^3$ до $(89,0 \pm 54,3) \times 10^3$; $Z = 1,97$; $p < 0,05$; $n = 13$). Таким образом, добавление L-фукозы корригировало эффект антибиотиков на снижение количества регуляторных Т-клеток. Снижение же экспрессии гена *Rorc* в ответ на добавление фукозы согласовывалось и с уменьшением количества IL-17 у мышей *Muc2^{-/-}* (рис. 4, д).

Стоит отметить, что фукоза приводила к повышению экспрессии генов *Tnf* и *Il6* и снижению *Ila* C57BL/6-мышей (рис. 4, в). Однако фукоза не повлияла на количество провоспалительных

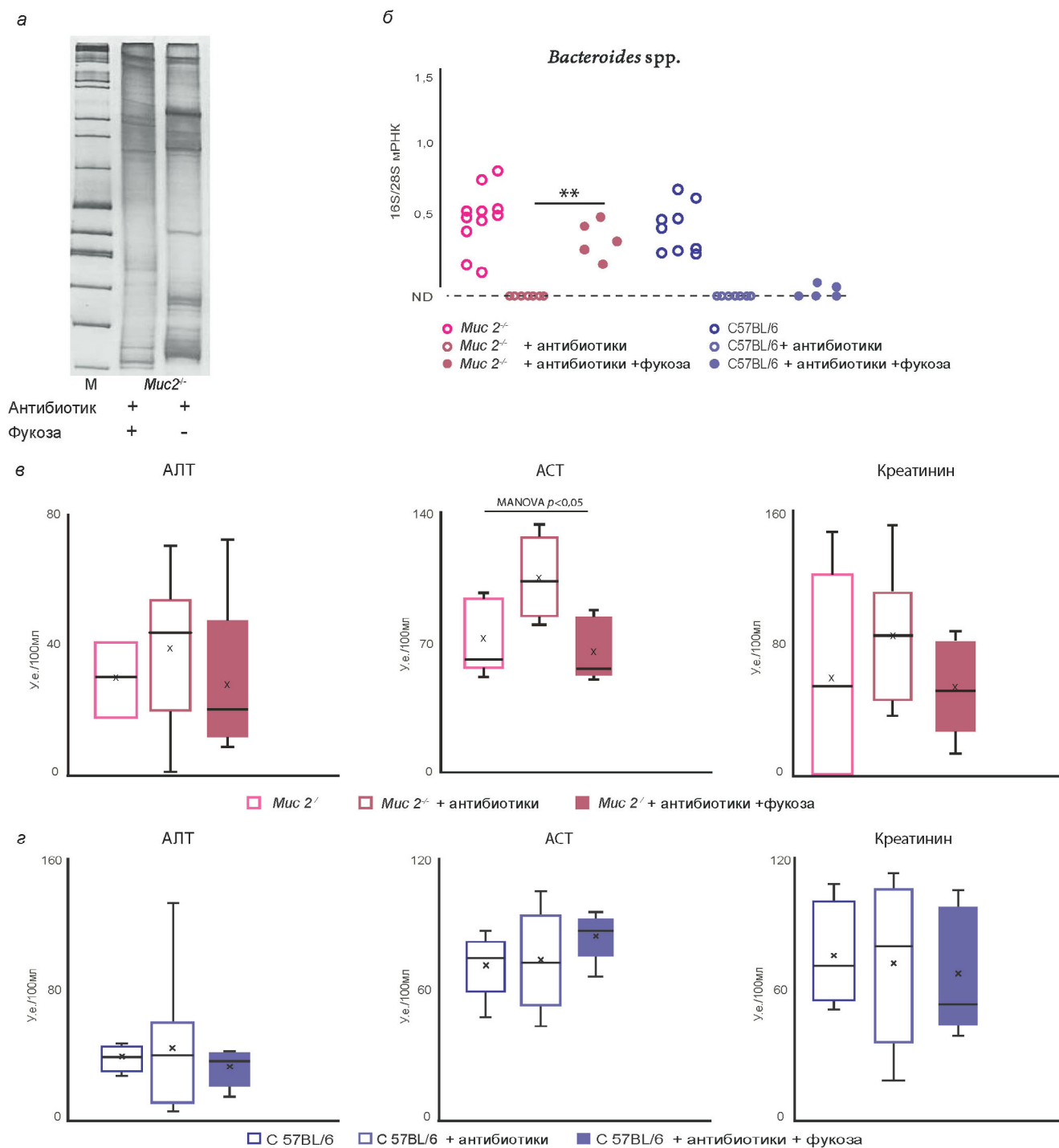


Рис. 5. Качественный и количественный бактериальный состав фекалий, биохимические показатели крови мышей *Muc2^{-/-}* и дикого типа C57BL/6 после применения антибиотиков или антибиотиков в сочетании с фукозой. *а* – Качественный состав кишечной микрофлоры у мышей *Muc2^{-/-}* после применения антибиотиков и фукозы, оценённый методом одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) варибельного (V4) участка 16s рНК. *б* – Количество бактериальной ДНК *Bacteroides* spp. в фекалиях у интактных мышей *Muc2^{-/-}* ($n = 22$) и дикого типа C57BL/6 ($n = 21$) после применения антибиотиков или антибиотиков в сочетании с фукозой. *в* – Биохимические показатели крови мышей линии *Muc2^{-/-}* ($n = 26$) до применения антибиотиков, на фоне приёма антибиотиков и антибиотиков с совокупности с фукозой. *г* – Биохимические показатели крови мышей линии C57BL/6 ($n = 17$) до применения антибиотиков, на фоне приёма антибиотиков и антибиотиков с совокупности с фукозой. ** $p < 0,01$ – точный критерий Фишера. ND – ниже порога чувствительности метода детекции

тельных цитокинов в ткани толстой кишки у C57BL/6-мышей (рис. 4, б). Достоверно снизилось на фоне приёма антибиотиков с фукозой количество мРНК транскрипционных факторов, участвующих в Th17- и Th1-иммунных ответах, и повысился *Tbx21* у C57BL/6-мышей (рис. 4, в). Но только количество IL-22, участвовавшего в Th17-ответе, точно также снизилось при добавлении фукозы к антибиотикам у мышей дикого типа (рис. 4, д). Фукоза повлияла на экспрессию и уровень белка отдельных иммунных факторов.

Таким образом, добавление фукозы, компонента муцина 2, при антибактериальной терапии мышей *Muc2^{-/-}* помогает сохранить *Bacteroides* spp., ослабить негативное действие антибиотиков и восстановить количество регуляторных Т-клеток в мезентериальных лимфатических узлах, но не влияет на другие иммунные показатели. Для понимания механизма действия фукозы необходимо в дальнейшем протестировать её на животных без сопутствующих патогенов, а также проверить её эффект на отдельных пулах иммунных клеток, таких как макрофаги, дендритные клетки и лимфоциты как в экспериментах *in vivo*, так и *in vitro*. Важно ещё оценить возможность утилизации L-фукозы различными бактериями, обитающими в ЖКТ и возможность её воздействия на запуск фукозилирования клеточных стенок бактерий. Если подобные гликаны клеточных стенок бактерий будут способны запускать толерантность, то они станут перспективными компонентами для поддерживающей терапии при ВЗК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение антибиотиков, глюкокортикоидов и иммуносупрессоров является ключевым звеном в медикаментозной терапии воспалительных заболеваний кишечника, при этом очевидно, что, в целом, это отрицательно влияет на симбиотическую микрофлору ЖКТ и в связи с угнетением иммунной системы и изменением метаболических процессов организма может способствовать укреплению колоний условно-патогенной и патогенной микрофлоры за счёт освобождения адгезивной поверхности и увеличения количества нутриентов, характерных для питания данных микроорганизмов [19]. Также известно, что признаком всех моделей ВЗК является истончение мукозального слоя кишечника и, как следствие, дисбаланс нормофлоры [37, 38]. Таким образом, для оценки состояния кишечной микробиоты и иммунного ответа организма было проведено сравне-

ние двух линий мышей, одна из которых (*Muc2^{-/-}*) имеет дефицит муцина 2 в кишечнике. При этом отличий по основным таксономическим группам бактерий у мышей обеих линий нет, а также у животных на протяжении всего эксперимента детектировали *Helicobacter* spp. Удлинение крипт, как анатомо-физиологическая особенность мышей *Muc2^{-/-}*, вероятно, имеет адаптивный механизм элиминации микрофлоры из кишечника.

Применение пребиотиков при ВЗК может иметь огромную перспективу. Так, в настоящем исследовании было показано, что пищевая L-фукоза частично восстанавливала *Bacteroides* spp. и помогала сохранить связанную с белком фукозу в ткани кишечника. Это сочеталось с восстановлением уровня АСТ. Но фукоза не показала эффективного снижения воспалительного процесса в ткани толстой кишки на фоне приёма антибиотиков. Отсутствие эффекта на воспаление может быть связано с негативным действием антибиотиков на количество Т-регуляторных клеток, повышение которых является характерной особенностью для мышей *Muc2^{-/-}*, у которых воспаление, по всей видимости, начинается с раннего возраста. Необходимо в дальнейшем исследовать возрастные особенности развития воспаления у мышей *Muc2^{-/-}*.

Исследования эффектов пищевой фукозы, как компонента муцина 2, необходимо продолжать в том числе на моделях без сопутствующих инфекций, а также более подробно рассмотреть её на культурах иммунных клеток, макрофагов и дендритных клеток, которые имеют рецептор, способный распознавать фукозу в составе гликанов бактерий. Также следует понять, может ли пищевая фукоза встраиваться в клеточные стенки бактерий, которые имеют различные фукозилтрансферазы. Все это подтверждает актуальность изучения фукозы и фукозиллированных гликанов как потенциальных активаторов Т-регуляторной функции.

Финансирование. Работа выполнена за счёт средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (тема № АААА-А21-121011990039-2 – приобретение и содержание лабораторных животных) и при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-64-47020 – анализ бактерий, экспрессия иммунных показателей).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам

учреждения, в котором проводились исследования, и утверждённым правовым актам РФ и международных организаций. Все манипуляции

с животными были одобрены межинститутской комиссией по биоэтике СО РАН (номер 18.6 от 14.10.2013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Князев О. В., Шкурко Т. В., Каграманова А. В., Веселов А. В., Никонов Е. Л. (2020) Эпидемиология воспалительных заболеваний кишечника. Современное состояние проблемы (обзор литературы), *Доказательная гастроэнтерология*, **9**, 66-73, doi: 10.17116/dokgastro2020902166.
2. Long, M. D., Hutfless, S., Kappelman, M. D., Khalili, H., Kaplan, G. G., et al. (2014) Challenges in designing a national surveillance program for inflammatory bowel disease in the United States, *Inflamm. Bowel Dis.*, **20**, 398-415, doi: 10.1097/01.MIB.0000435441.30107.8b.
3. Камалова А. А., Сафина Э. Р., Низамова Р. А., Зайнетдинова М. Ш., Квитко, Э. М. (2020) Питание при воспалительных заболеваниях кишечника у детей, *Российский вестник перинатологии и педиатрии*, **65**, 145-151, doi: 10.21508/1027-4065-2020-65-5-145-151.
4. Ananthakrishnan, A. N. (2013) Environmental risk factors for inflammatory bowel disease, *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, **9**, 367-374.
5. Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., et al. (2009) Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3698-3703, doi: 10.1073/pnas.0812874106.
6. Abrams, G. D., Bauer, H., and Sprinz, H. (1963) Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice, *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.*, **12**, 355-364.
7. Roswall, J., Olsson, L. M., Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, S., Tremaroli, V., et al. (2021) Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life, *Cell Host Microbe*, **29**, 765-776.e763, doi: 10.1016/j.chom.2021.02.021.
8. Franke, A., McGovern, D. P. V., Barrett, J. C., Wang, K., Radford-Smith, G. L., et al. (2010) Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci, *Nat. Genet.*, **42**, 1118-1125, doi: 10.1038/ng.717.
9. Hooper, L. V., Littman, D. R., and Macpherson, A. J. (2012) Interactions between the microbiota and the immune system, *Science*, **336**, 1268-1273, doi: 10.1126/science.1223490.
10. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., et al. (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria, *Cell*, **139**, 485-498, doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033.
11. Ивашкин В. Т., Шельгин Ю. А., Абдулганиева Д. И., Абдулхаков Р. А., Алексеева О. П., и др. (2015) Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению взрослых больных язвенным колитом, *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*, **1**, 48-65.
12. Fox, J. G., and Lee, A. (1997) The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals, *Lab. Anim. Sci.*, **47**, 222-255.
13. Goldman, C. G., and Mitchell, H. M. (2010) *Helicobacter* spp. other than *Helicobacter pylori*, *Helicobacter*, **15**, 69-75, doi: 10.1111/j.1523-5378.2010.00780.x.
14. Kienesberger, S., Cox, L. M., Livanos, A., Zhang, X. S., Chung, J., et al. (2016) Gastric *Helicobacter pylori* infection affects local and distant microbial populations and host responses, *Cell Rep.*, **14**, 1395-1407, doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.017.
15. Kullberg, M. C., Ward, J. M., Gorelick, P. L., Caspar, P., Hieny, S., et al. (1998) *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism, *Infect. Immun.*, **66**, 5157-5166, doi: 10.1128/iai.66.11.5157-5166.1998.
16. Shomer, N. H., Dangler, C. A., Schrenzel, M. D., and Fox, J. G. (1997) *Helicobacter bilis*-induced inflammatory bowel disease in scid mice with defined flora, *Infect. Immun.*, **65**, 4858-4864, doi: 10.1128/iai.65.11.4858-4864.1997.
17. Christopher, P., Monceaux, T. L. T., Boktor, M., Jordan, P., Adegboyega, P., et al. (July 2013) *Helicobacter* infection decreases basal colon inflammation, but increases disease activity in experimental IBD, *Open J. Gastroenterol.*, 177-189, doi: 10.4236/ojgas.2013.33029.
18. Jiang, H. Q., Kushnir, N., Thurnheer, M. C., Bos, N. A., and Cebra, J. J. (2002) Monoassociation of SCID mice with *Helicobacter muridarum*, but not four other enterics, provokes IBD upon receipt of T cells, *Gastroenterology*, **122**, 1346-1354, doi: 10.1053/gast.2002.32959.
19. Ивашкин К. В., Решетова М. С., Зольникова О. Ю., Корнеева В. Р., и др. (2020) Место пробиотиков в комплексной терапии различных заболеваний желудочно-кишечного тракта, *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*, **30**, 42-48, doi: 10.22416/1382-4376-2020-30-1-42-48.
20. Weingarden, A. R., and Vaughn, B. P. (2017) Intestinal microbiota, fecal microbiota transplantation, and inflammatory bowel disease, *Gut Microbes*, **8**, 238-252, doi: 10.1080/19490976.2017.1290757.
21. Шербakov П. Л., Белова Н. Д., Генерозов Э. В., Жгун Е. С., и др. (2019) Применение фекальной трансплантации в лечении заболеваний пищеварительного тракта (первый клинический опыт), *Доктор.Ру.*, **3**, 40-46, doi: 10.31550/1727-2378-2019-158-3-40-46.
22. Lin, J., and Hackam, D. J. (2011) Worms, flies and four-legged friends: the applicability of biological models to the understanding of intestinal inflammatory diseases, *Disease Models Mech.*, **4**, 447-456, doi: 10.1242/dmm.007252.
23. Walters, E. M., Wolf, E., Whyte, J. J., Mao, J., Renner, S., et al. (2012) Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model, *BMC Med. Genom.*, **5**, 55, doi: 10.1186/1755-8794-5-55.
24. Coors, M. E., Glover, J. J., Juengst, E. T., and Sikela, J. M. (2010) The ethics of using transgenic non-human primates to study what makes us human, *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 658-662, doi: 10.1038/nrg2864.
25. Ideland, M. (2009) Different views on ethics: How animal ethics is situated in a committee culture, *J. Med. Ethics*, **35**, 258-261, doi: 10.1136/jme.2008.026989.
26. Robinson, A. M., Sakkal, S., Park, A., Jovanovska, V., Payne, N., et al. (2014) Mesenchymal stem cells and conditioned medium avert enteric neuropathy and colon dysfunction in guinea pig TNBS-induced colitis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **307**, G1115-G1129, doi: 10.1152/ajpgi.00174.2014.
27. Hungate, R.E. (1966) *The Rumen and Its Microbes*, 1st Edn., Academic Press/New York and London.

28. Kathrani, A., Lee, H., White, C., Catchpole, B., Murphy, A., et al. (2014) Association between nucleotide oligomerisation domain two (Nod2) gene polymorphisms and canine inflammatory bowel disease, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **161**, 32-41, doi: 10.1016/j.vetimm.2014.06.003.
29. Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature*, **420**, 520-562, doi: 10.1038/nature01262.
30. Jimenez, J. A., Uwiera, T. C., Douglas Inglis, G., and Uwiera, R. R. E. (2015) Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals, *Gut Pathog.*, **7**, 29, doi: 10.1186/s13099-015-0076-y.
31. Westbrook, A. M., Szakmary, A., and Schiestl, R. H. (2016) Mouse models of intestinal inflammation and cancer, *Arch. Toxicol.*, **90**, 2109-2130, doi: 10.1007/s00204-016-1747-2.
32. Wirtz, S., Popp, V., Kindermann, M., Gerlach, K., Weigmann, B., et al. (2017) Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation, *Nat. Protocols*, **12**, 1295-1309, doi: 10.1038/nprot.2017.044.
33. Cano-Gamez, E., Soskic, B., Roumeliotis, T. I., So, E., Smyth, D. J., et al. (2020) Single-cell transcriptomics identifies an effectorness gradient shaping the response of CD4⁺ T cells to cytokines, *Nat. Commun.*, **11**, 1801, doi: 10.1038/s41467-020-15543-y.
34. Mizoguchi, A., Takeuchi, T., Himuro, H., Okada, T., and Mizoguchi, E. (2016) Genetically engineered mouse models for studying inflammatory bowel disease, *J. Pathol.*, **238**, 205-219, doi: 10.1002/path.4640.
35. Литвинова Е. А., Ачасова К. М., Борисова М. А., Женило С. В., Прохорчук Е. Б., и др. (2018) Роль гена *Kaiso* в развитии воспаления у мышей с дефицитом Муцина-2, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **22**, 1078-1083, doi: 10.18699/VJ18.453.
36. Литвинова Е. А., Беляев М. Д., Прохорчук А. В., Коростина В. С., Прохорчук Е. Б., и др. (2015) Вклад кишечного муцина-2 в эффективность антибактериальной терапии *Helicobacter* spp. у лабораторных мышей, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **19**, 494-498, doi: 10.18699/VJ15.066.
37. Kawashima, H. (2012) Roles of the gel-forming MUC2 mucin and its O-glycosylation in the protection against colitis and colorectal cancer, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1637-1641, doi: 10.1248/bpb.b12-00412.
38. Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., and Juge, N. (2015) Mucin glycan foraging in the human gut microbiome, *Front. Genet.*, **6**, 81, doi: 10.3389/fgene.2015.00081.
39. Martens, E. C., Roth, R., Heuser, J. E., and Gordon, J. I. (2009) Coordinate regulation of glycan degradation and polysaccharide capsule biosynthesis by a prominent human gut symbiont, *J. Biol. Chem.*, **284**, 18445-18457, doi: 10.1074/jbc.M109.008094.
40. Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., et al. (2012) Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment, *Genome Biol.*, **13**, R79, doi: 10.1186/gb-2012-13-9-r79.
41. Pickard, J. M., and Chervonsky, A. V. (2015) Intestinal fucose as a mediator of host-microbe symbiosis, *J. Immunol.*, **194**, 5588-5593, doi: 10.4049/jimmunol.1500395.
42. Litvinova, E. A., Bets, V. D., Feofanova, N. A., Gvozdeva, O. V., Achasova, K. M., et al. (2021) Dietary fucose affects macrophage polarization and reproductive performance in mice, *Nutrients*, **13**, 855, doi: 10.3390/nu13030855.
43. Borisova, M. A., Snytnikova, O. A., Litvinova, E. A., Achasova, K. M., Babochkina, T. I., et al. (2020) Fucose ameliorates tryptophan metabolism and behavioral abnormalities in a mouse model of chronic colitis, *Nutrients*, **12**, 445, doi: 10.3390/nu12020445.
44. Ачасова К. М., Гвоздева О. В., Кожевникова Е. Н., Литвинова Е. А. (2021) Регляторные Т-клетки лимфатических узлов у *Muc2*^{-/-} мышей с *Helicobacter* spp., *Медицинская иммунология*, **23**, 629-634, doi: 10.15789/1563-0625-LNR-2268.
45. Ачасова К. М., Литвинова Е. А. (2019) Мыши с нокаутом гена *Muc2* – модель для оценки способов воздействия на микрофлору кишечника, *Российский иммунологический журнал*, **13**, 713-715, doi: 10.31857/S102872210006753-3.
46. Литвинова Н. А., Кожевникова Е. Н., Литвинова Е. А. (2020) Влияние L-фукозы на макрофаги и Т-клетки при нарушении микрофлоры кишечника на экспериментальной модели ВЗК, *Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий/материалы I Международной научно-практической конференции*, 21-25.
47. Mähler Convenor, M., Berard, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., et al. (2014) FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units, *Lab. Animals*, **48**, 178-192, doi: 10.1177/0023677213516312.
48. Borisova, M. A., Achasova, K. M., Morozova, K. N., Andreyeva, E. N., Litvinova, E. A., et al. (2020) Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium, *Sci. Rep.*, **10**, 21135, doi: 10.1038/s41598-020-78141-4.
49. Achasova, K. M., Kozhevnikova, E. N., Borisova, M. A., and Litvinova, E. A. (2021) Fucose ameliorates *Trichomonas* sp.-associated illness in antibiotic-treated *Muc2*^{-/-} mice, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10699, doi: 10.3390/ijms221910699.
50. Litvinova, E. A., Kozhevnikova, E. N., Achasova, K. M., Kontsevaya, G. V., and Moshkin, M. P. (2017) Eradication of *Helicobacter* spp. in mucin2-deficient mice, *Lab. Animals*, **51**, 311-314, doi: 10.1177/0023677216670687.
51. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
52. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics*, **13**, 134, doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
53. Okonechnikov, K., Golosova, O., and Fursov, M. (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit, *Bioinformatics*, **28**, 1166-1167, doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.
54. Schwiager, F., and Tebbe, C. (1999) A new approach to utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4870-4876, doi: 10.1128/AEM.64.12.4870-4876.1998.
55. Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G., and Gresshoff, P. M. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **196**, 80-83, doi: 10.1016/0003-2697(91)90120-i.
56. Heazlewood, C. K., Cook, M. C., Eri, R., Price, G. R., Tauro, S. B., et al. (2008) Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis, *PLoS Med.*, **5**, e54, doi: 10.1371/journal.pmed.0050054.
57. Allen, A., Hutton, D. A., and Pearson, J. P. (1998) The MUC2 gene product: a human intestinal mucin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **30**, 797-801, doi: 10.1016/S1357-2725(98)00028-4.

58. McGovern, D. P., Jones, M. R., Taylor, K. D., Marciante, K., Yan, X., et al. (2010) Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease, *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3468-3476, doi: 10.1093/hmg/ddq248.
59. Crouch, L. I., Liberato, M. V., Urbanowicz, P. A., Baslé, A., Lamb, C. A., et al. (2020) Prominent members of the human gut microbiota express endo-acting O-glycanases to initiate mucin breakdown, *Nat. Commun.*, **11**, 4017, doi: 10.1038/s41467-020-17847-5.
60. Tadesse, S., Corner, G., Dhima, E., Houston, M., Guha, C., et al. (2017) MUC2 mucin deficiency alters inflammatory and metabolic pathways in the mouse intestinal mucosa, *Oncotarget*, **8**, 71456-71470, doi: 10.18632/oncotarget.16886.
61. Luijckx, Y., Bleumink, N. M. C., Jiang, J., Overkleeft, H. S., Wösten, M., et al. (2020) Bacteroides fragilis fucosidases facilitate growth and invasion of Campylobacter jejuni in the presence of mucins, *Cell. Microbiol.*, **22**, e13252, doi: 10.1111/cmi.13252.

THE ROLE OF GLYCOPROTEIN MUCIN 2 AND L-FUCOSY IN THE INTERACTION OF IMMUNITY AND MICROFLORA OF EXPERIMENTAL MODEL OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

V. D. Betz¹, K. M. Achasova^{2,3}, M. A. Borisova⁴, E. N. Kozhevnikova^{1,2,3}, and E. A. Litvinova^{2*}

¹ Novosibirsk State Agrarian University, 630039 Novosibirsk, Russia

² Research Institute of Neurosciences and Medicine, 630117 Novosibirsk, Russia; e-mail: litvinovaea@physiol.ru

³ Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

⁴ Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

Many factors underlie the development of inflammatory bowel diseases in humans. In particular, an imbalance in the microbiota and a thinning of the mucosal layer in the large intestine play a huge role. Pathogenic agents exacerbate disease progression. In view of this role, a study was carried out on the effect of mucin 2 deficiency on the diversity of intestinal microflora in an experimental model of Muc2 knockout mice in the presence of Helicobacter spp. We also evaluated the regenerative and anti-inflammatory effect of dietary L-fucose in *Muc2*^{-/-} mice. For this purpose, the bacterial diversity in feces was studied in animals before and after the application of antibacterial therapy and the role of dietary L-fucose in its recovery was assessed. To determine the effect of bacterial imbalance and the role of fucose on the immune system, the mRNA levels of the genes of proinflammatory cytokines (*Tnf*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6*) and transcription factors of T cells (*Foxp3* – Treg, *Rorc* – Th17, *Tbx21* – Th1) were determined in the colon tissue of *Muc2*^{-/-} mice. A significant elimination of bacteria against the background of antibiotic use caused a decrease in fucose in the intestine, and also provoked a decrease in the transcription factor T of regulatory cells (*Foxp3*). When food L-fucose is added to antibiotics, the level of bacterial DNA of Bacteroides spp. in the feces of mice, *Muc2*^{-/-} was partially restored. T regulatory cells are involved in the regulation of inflammation in *Muc2*^{-/-} mice. Antibiotics reduced their number, which did not reduce the inflammatory response to infection. Fucose, as a component of mucin2, helps preserve Bacteroides spp. During antibiotic therapy in *Muc2*^{-/-} mice and restore biochemical parameters, but does not affect the inflammatory response.

Keywords: IBD, macrophages, pathogens, microbiota, antibiotics, L-fucose, mucin 2