

# САЛЬМОНЕЛЛА-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ КЛЮЧЕВЫХ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ БАКТЕРИЙ ВЛИЯЮТ НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ *Foxp3* И *RORγt* В КИШЕЧНО-АССОЦИИРОВАННОЙ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ КРЫС

Ю.В. Букина<sup>1</sup>, Л.Я. Федонюк<sup>2</sup>, Г.Д. Коваль<sup>3</sup>, Ю.А. Шеховцева<sup>4</sup>, А.М. Камышный<sup>1</sup>, А.А. Губарь<sup>1</sup>, В.А. Губка<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

<sup>2</sup> Тернопольский государственный медицинский университет, г. Тернополь, Украина

<sup>3</sup> Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы, Украина

<sup>4</sup> Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

**Резюме.** Кишечный микробиом участвует во многих физиологических процессах хозяина, способствует формированию и поддержанию иммунного гомеостаза за счет регуляции иммунных реакций, направленных на защиту от колонизации патогенами. Особую роль в дифференцировке различных субпопуляций Т-лимфоцитов играют сегментарные нитевидные бактерии (*Segmented filamentous bacteria*, SFB), способные индуцировать в кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) дифференцировку провоспалительных Th17-клеток, а представители рода *Clostridium* (cluster IV и XIVa) и *Bacteroides fragilis* (полисахарид А [PSA]) стимулируют образование Т-регуляторных клеток (Treg) и продукцию супрессорного цитокина IL-10. Важными метаболитами *B. fragilis* являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), которые способны активировать клетки КАЛТ через рецептор FFAR2. Уменьшение концентрации КЦЖК снижает численность Treg в кишечнике и нарушает баланс Th17/Treg. Эти изменения напрямую ведут к снижению уровня мРНК *FFAR2*, *Foxp3* и повышению экспрессии *RORγt* в КАЛТ. Поэтому целью работы было определить уровень ключевых иммунорегуляторных бактерий в пристеночной микрофлоре кишечника крыс и его влияние на транскрипционную активность генов *Foxp3* и *RORγt* в КАЛТ при сальмонелла-индуцированном воспалении и на фоне введения ванкомицина и *B. fragilis*. Для определения родовой и видовой принадлежности бактерий, а также их количества в микрофлоре крыс применяли метод полимеразной цепной реакции (ПЦР-РВ) с идентификацией их по генам 16S rDNA. Для изучения транскрипционной активности генов использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЛР). В ходе эксперимен-

## Адрес для переписки:

Букина Юлия Вячеславовна  
69035, Украина, Запорожье, пр. Маяковского, 26,  
Запорожский государственный медицинский университет.  
Тел.: +38 096 400-46-26; +38 095 512-09-29.  
E-mail: lingvus25@gmail.com

## Contacts:

Yuliia V. Bukina  
69035, Ukraine, Zaporozhye, pr. Majakovskogo, 26,  
Zaporozhye State Medical University.  
Phone: +38 096 400-46-26; +38 095 512-09-29.  
E-mail: lingvus25@gmail.com

## Библиографическое описание:

Букина Ю.В., Федонюк Л.Я., Коваль Г.Д., Шеховцева Ю.А., Камышный А.М., Губарь А.А., Губка В.А. Сальмонелла-индуцированные изменения уровня ключевых иммунорегуляторных бактерий влияют на транскрипционную активность генов *Foxp3* и *RORγt* в кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани крыс // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 4. С. 671–685. doi: 10.15789/2220-7619-SIC-1151

## Citation:

Bukina Yu.V., Fedoniuk L.Ya., Koval G.D., Shekhovtsova Iu.O., Kamyshnyi A.M., Gubar A.O., Gubka V.O. Salmonella-induced changes in the level of key immunoregulatory bacteria affect the transcriptional activity of the *Foxp3* and *RORγt* genes in the gut-associated lymphoid tissue of rats // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 4, pp. 671–685. doi: 10.15789/2220-7619-SIC-1151

та при введении животным ванкомицина и сальмонелл наблюдалось увеличение уровня SFB и уменьшение *A. muciniphila*, *F. prausnitzii*. Также при инфицировании крыс *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином отмечалось возрастание численности SFB на фоне выраженного уменьшения *Bacteroides–Prevotella* group, *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. кластеров XIV, IV и *F. prausnitzii*, что приводило к уменьшению уровня экспрессии мРНК генов *Foxp3*<sup>+</sup> и увеличению *RORγt*<sup>+</sup> соответственно. Однако введение *B. fragilis* животным, получавшим *S. Enteritidis* или *S. Typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином, обуславливало уменьшение уровня SFB и мРНК *RORγt*<sup>+</sup> и, наоборот, увеличивало численность *Bacteroides–Prevotella* group, *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. кластеров XIV, IV, *F. prausnitzii* и экспрессию генов *Foxp3*<sup>+</sup>, что свидетельствует о восстановлении гомеостаза кишечного микробиома. Полученные результаты показали, что *B. fragilis* может с успехом применяться при лечении воспалительных заболеваний кишечника или заболеваний с нарушением барьерной функции кишечника.

**Ключевые слова:** микробиом, кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань, сальмонелла, ванкомицин, бактероиды, экспрессия, ПЦР-РВ.

## SALMONELLA-INDUCED CHANGES IN THE LEVEL OF KEY IMMUNOREGULATORY BACTERIA AFFECT THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF THE *Foxp3* AND *RORγt* GENES IN THE GUT-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE OF RATS

Bukina Yu.V.<sup>a</sup>, Fedoniuk L.Ya.<sup>b</sup>, Koval G.D.<sup>c</sup>, Shekhovtsova Iu.O.<sup>d</sup>, Kamyshnyi A.M.<sup>a</sup>, Gubar A.O.<sup>a</sup>, Gubka V.O.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

<sup>b</sup> Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine

<sup>c</sup> Bukovinian State Medical University, Chernovtsy, Ukraine

<sup>d</sup> Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

**Abstract.** Intestinal microbes involved in many physiological processes owner, contributes to the formation and maintenance of immune homeostasis by regulating immune responses to protect against colonization by pathogens. A special role in the differentiation of various subpopulations of T-lymphocytes play the segmental filamentous bacteria (*Segmented filamentous bacteria*, SFB), capable of inducing a gut-associated lymphoid tissue (GALT) differentiation proinflammatory Th17-cells and members of the genus *Clostridium* (cluster IV and XIVa) and *Bacteroides fragilis* (polysaccharide A [PSA]), stimulating the formation of regulatory T-cells (Treg) and production of suppressor of cytokine IL-10. Important metabolites of *B. fragilis* are short-chain fatty acids (SCFA), which are able to activate GALT cells through the *FFAR2* receptor. Lowering of the SCFA concentration leads to the reduction of the number of Treg in the intestine and breaks Th17/Treg balance. These changes lead to direct reducing of mRNA *FFAR2*, *Foxp3* expression and increasing in *RORγt* GALT. Therefore, the goal was to determine the level of the key in the edge immunoregulatory bacteria intestinal microflora rats and their effects on the transcriptional activity of the genes *Foxp3* and *RORγt* in GALT with Salmonella-induced inflammation and during administration of vancomycin and *B. fragilis*. To determine the genus and species of bacteria, as well as their number in the microflora of rats, was used the method of polymerase chain reaction (PCR-RV) with their identification by 16S rDNA genes. To study the transcriptional activity of genes using polymerase chain reaction reverse transcription real-time (RT-PCR). During the experiment with the introduction of animals vancomycin and Salmonella there was an increase in the level of SFB and a decrease in *A. muciniphila*, *F. prausnitzii*. Also, during infecting rats with *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* on the background of pre-treatment with vancomycin, there was an increase in the number of SFBs against the background of a pronounced decrease in *Bacteroides–Prevotella* group, *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. clusters XIV, IV, and *F. prausnitzii*, which led to a decrease in the expression level of *Foxp3*<sup>+</sup> mRNA and an increase in *RORγt*<sup>+</sup>, respectively. However, administration of *B. fragilis* to animals receiving *S. Enteritidis* or *S. Typhimurium* against pretreatment with vancomycin caused a decrease in the level of SFB and mRNA *RORγt*<sup>+</sup>, and, conversely, increased the number of *Bacteroides–Prevotella* group, *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. clusters XIV, IV, *F. prausnitzii* and expression of *Foxp3*<sup>+</sup> genes, which indicates the restoration of the homeostasis of the intestinal microbiome. The obtained results showed that *B. fragilis* can be successfully used in the treatment of inflammatory bowel diseases or diseases with impaired intestinal barrier function.

**Key words:** microbiome, gut-associated lymphoid tissue, Salmonella, Vancomycin, Bacteroides, expression, RT-PCR.

Многовековая коэволюция хозяина и микробов привели к их симбиозу, в котором микробиота участвует во многих физиологических процессах хозяина, а он, в свою очередь, предоставляет субстрат для питания бактерий [29].

В дополнение к метаболическим функциям, микробиота способствует формированию и поддержанию иммунного гомеостаза за счет регуляции иммунных реакций, направленных на защиту от колонизации патогенами [30].

Среди огромного количества комменсальных бактерий, населяющих ЖКТ, особую роль играют отдельные виды ключевых иммунорегуляторных бактерий, которые направляют дифференцировку различных субпопуляций Т-лимфоцитов, а Т-клеточные рецепторы (TCR) этих иммунных клеток являются комменсал-специфическими [19, 37]. В этом контексте сегментарные нитевидные бактерии (SFB) являются индукторами дифференцировки Т-хелперов 17 типа (Th17), а большинство SFB-индуцированных Th17-клеток, в свою очередь, являются специфичными для антигенов SFB. Используя гибридные TCR у SFB-колонизированных мышей, Yang и соавт. показали, что большинство TCR Th17-клеток специфически распознают антигены SFB [40].

Среди обитающих в кишечнике 19 кластеров (от I до XIX) класса *Clostridia* наибольшим Treg-индуцирующим потенциалом обладают представители кластеров IV и XIVa (также известные как группы *Clostridium leptum* и *Clostridium coccoides* соответственно). *Clostridium* кластера XIVa включает в себя виды, относящиеся к родам *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Lachnospira*, *Roseburia* и *Butyrivibrio*. *Clostridium* кластера IV состоит из родов *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* и *Anaerofilum* [26]. В частности, Treg-индуцирующая активность у мышей была обнаружена в коктейле из 46 штаммов рода *Clostridium*, принадлежащих к кластерам IV и XIVa [6]. Был также идентифицирован коктейль из 17 человеческих штаммов *Clostridia*, обладающий активностью Treg-индуцирования [5]. Одним из представителей *Clostridium* кластера IV является вид *Faecalibacterium prausnitzii*, влияющий на баланс Th17/Treg в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) [42]. *F. prausnitzii* — один из основных производителей бутирата в кишечнике и способен уменьшать воспаление за счет стимуляции продукции большого количества IL-10 и блокады активации ядерного фактора NF-κB, что приводит к подавлению выработки провоспалительных цитокинов (IFNγ, TNFα, IL-1β, IL-8, IL-12) и повышению активности *Foxp3*<sup>+</sup> Tregs в КАЛТ [12]. В 2016 г. в супернатантах культур *F. prausnitzii* идентифицировали белок, названный микробной противовоспалительной молекулой (MAM) [32]. Было показано, что по крайней мере семь пептидов белка MAM *F. prausnitzii* индуцируют продукцию IL-10 *in vitro* и блокируют развитие DSS-индуцированного колита у мышей [8].

Индукторами дифференцировки Т-регуляторных клеток в кишечнике являются также представители филума *Bacteroidetes* *Bacteroides fragilis* и *Bacteroides thetaiotaomicron* [39]. Важными

метаболитами *B. fragilis* являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), выполняющие роль связующего звена между микробиотой и иммунной системой, которые активируют клетки КАЛТ через рецептор *FFAR2*. Уменьшение концентрации таких КЦЖК, как бутират, пропионат и ацетат, снижает численность Treg в кишечнике и нарушает баланс Th17/Treg, а уровень мРНК *FFAR2* изменяется при развитии экспериментальных ВЗК [36]. Ранее мы показали, что введение *B. fragilis* животным, предобработанным ванкомицином, с последующим инфицированием *S. Typhimurium* повышает уровень мРНК гена *FFAR2* в КАЛТ, влияет на экспрессию эффекторных белков сальмонелл SipA, SopB, SopE2 [1], а также обуславливает увеличение уровня концентрации КЦЖК, что способствует снижению сальмонелла-индуцированного воспаления [9].

Значительный интерес представляет и иммунорегуляторный потенциал *Akkermansia muciniphila* — муцин-деградирующей бактерии из филума *Verrucomicrobia*. Plovier и соавт. (2017) показали, что введение *A. muciniphila* либо ее наружного мембранного белка Amuc\_1100 активирует Toll-подобные рецепторы 2 типа (TLR2), сигнализация через которые увеличивала экспрессию генов, кодирующих белки плотных контактов claudin 3 и occludin [31].

Помимо иммунорегуляторного потенциала вышеуказанных комменсальных бактерий, значительный интерес представляет их способность повышать устойчивость к колонизации и инвазии возбудителей за счет конкурентного вытеснения за метаболиты, выработки ингибирующих веществ и развития иммунных реакций в КАЛТ. Поэтому целью работы было определить уровень ключевых иммунорегуляторных бактерий в пристеночной микробиоте кишечника крыс и его влияние на транскрипционную активность генов *Foxp3* и *RORγt* в КАЛТ при сальмонелла-индуцированном воспалении и на фоне введения ванкомицина и *B. fragilis*.

## Материалы и методы

Исследования проводились на 120 самцах крыс линии Вистар массой 110–150 г в возрасте 2–3 месяца. Животные были разделены на восемь групп по 15 крыс в каждой группе. Группа 1 — контрольные животные; группа 2 — Vancomycin (животные, которым вводили ванкомицин в дозе 50 мг/кг); группа 3 — *S. Enteritidis* (животные, которым вводили *S. Enteritidis* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл); группа 4 — *S. Typhimurium* (животные, которым вводили *S. Typhimurium* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл); группа 5 — Vancomycin+*S. Enteritidis* (животные, получившие при пероральном вве-

дении ванкомицин в дозе 50 мг/кг и через сутки получившие бактериальную нагрузку *S. Enteritidis* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл); группа 6 — Vancomycin+*S. Typhimurium* (животные, получившие при введении *per os* ванкомицин в дозе 50 мг/кг и через сутки получившие бактериальную нагрузку *S. Typhimurium* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл); группа 7 — Vancomycin+*S. Enteritidis*+*B. fragilis* (животные, получившие при пероральном введении ванкомицин в дозе 50 мг/кг, через сутки — бактериальную нагрузку *S. Enteritidis* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл и на следующий день *B. fragilis* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл); группа 8 — Vancomycin+*S. Typhimurium*+*B. fragilis* (животные, получившие при пероральном введении ванкомицин в дозе 50 мг/кг, через сутки — бактериальную нагрузку *S. Typhimurium* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл и на следующий день — *B. fragilis* в количестве  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл). На пятые сутки крыс выводили из эксперимента с соблюдением принципов эвтаназии. Заражение животных проводили суточными культурами сальмонелл, выращенных на 1,5% МПА, полученных из музея штаммов микроорганизмов Украинского центра по контролю и мониторингу заболеваний МОЗ Украины. Культуры бактериоидов выращивали на питательных средах, приготовленных согласно методическим рекомендациям «Лабораторная диагностика гнойно-воспалительных заболеваний, обусловленных аспорогенными анаэробными микроорганизмами» (Харьков, 2000). Бактериальные суспензии стандартизировали при помощи денситометра DEN-1B (Biosan, Латвия) по МакФарланду (McF). Для введения крысам *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *B. fragilis* нами были приготовлены суспензии в концентрации 1,0 стандарта McF, что соответствует концентрации  $3 \times 10^8$  КОЕ/мл.

Молекулярно-генетические исследования по определению родовой и видовой принадлежности бактерий, а также их количественного содержания в микробиоте крыс проводились методом полимеразной цепной реакции (ПЦР-РВ) с идентификацией их по генам 16S rDNA. В качестве материала для ПЦР-РВ исследований микробиома использовали пристеночное содержимое кишечника крыс. Соскобы со слизистой оболочки подвздошной кишки лизировали в буфере ASL (Qiagen, Германия). Выделение тотальной ДНК из соскобов выполнялось в соответствии с инструкциями производителя. Обилие кишечных бактерий измеряли количественной ПЦР на термоциклере CFX-96 (Bio-Rad, США) с использованием SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific, США) и специфических видо- и родоспецифических праймеров (Thermo Scientific, США) (см. табл. 1). Количественные результаты нормировали по универсальной 16S rDNA и анализировали с использованием метода  $\Delta Ct$ . Статистический анализ выполнялся с использованием GraphPad Prism (GraphPad Software).

Определение уровня транскрипционной активности генов *Foxp3*, *ROR $\gamma$ t* в КАЛТ проводилось с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ПЦР-ОТ). РНК выделяли из сгруппированных лимфоидных узелков (Пейеровых бляшек) подвздошной кишки крыс. Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора «Trizol RNA Prep 100» (Лаборатория Изоген, Россия), который содержит Trizol reagent и ExtraGene. Для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали «Набор реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ-1)» (Синтол, Россия). Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала: 2 мкл тотальной РНК, 1 мкл

**Таблица 1. Праймеры для определения бактериальных групп по 16S rDNA**

Table 1. Primers for the determination of bacterial groups of 16S rDNA

16S universal	UniF340: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'
16S universal	UniR514: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'
Segmented filamentous bacteria (SFB)	SFB736F: 5'-GACGCTAGGCATGAGAGCAT-3'
Segmented filamentous bacteria (SFB)	SFB844R: 5'-GACGGCACGGATTGTTATTCA-3'
<i>Akkermansia muciniphila</i>	F: 5'-CAGCACGTGAAGGTGGGGAC-3'
<i>Akkermansia muciniphila</i>	R: 5'-CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT-3'
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	F: 5'-CCCTTCAGTGCCGCAGT-3'
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	R: 5'-GTCGAGGATGTCAAGAC-3'
<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	Bac303FGAAGGTCCCCACATTG
<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	Bac708RCAATCGGAGTTCTTCGTG
<i>Clostridial</i> cluster IV	F: TTAACACAATAAGTAATCCACCTGG
<i>Clostridial</i> cluster IV	R: ACCTTCCTCCGTTTTGTCAAC
<i>Clostridial</i> cluster XIV	F: CGGTACCTGACTAAGAAGC
<i>Clostridial</i> cluster XIV	R: AGTTTCATTCTTGCAGACG

Random-6 праймера, 8,5 мкл деионизированной  $H_2O$ , очищенной от нуклеаз, 12,5 мкл реакционной смеси и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Обратную транскрипцию проводили при  $45^\circ C$  на протяжении 45 мин с последующим нагреванием для инактивирования MMLV-RT на протяжении 5 мин при  $92^\circ C$ .

Для определения уровня экспрессии исследуемых генов крыс *Foxp3*, *ROR $\gamma$ t* использовали набор реактивов Maxima SYBR Green qPCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific, США) и амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США). Финальная реакционная смесь для амплификации содержала краситель SYBR Green, ДНК-полимеразу Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого и обратного специфических праймеров, 1 мкл матрицы (кДНК). Реакционную смесь доводили до общего объема 25 мкл добавлением деионизированной  $H_2O$ . Специфические пары праймеров (5'–3') для анализа исследуемых и референсных генов были подобраны при помощи программного обеспечения Primer-Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) и изготовлены фирмами Metabion (Германия) и Thermo Scientific (США) (см. табл. 2).

После начальной денатурации на протяжении 10 мин при  $95^\circ C$  амплификация состояла из 45 циклов и проводилась при следующих условиях: денатурация —  $95^\circ C$ , 15 с; отжиг —  $59$ – $61^\circ C$ , 30–60 с; элонгация —  $72^\circ C$ , 30 с. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследуемых генов крыс был использован ген глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH). Относительное нормализованное количество кДНК целевых генов определяли сравнительным методом  $\Delta\Delta Ct$ . Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, США). В эксперимент включали отрицательные контроли без добавления кДНК матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК матрицы в синтезе кДНК, без добавления фрагмента в синтезе кДНК. Все реакции амплификации выполняли на индивидуальных образцах в трех повторах.

## Результаты и обсуждение

В ходе проведения исследований полученные нами результаты показали, что при введении экспериментальным животным ванкомицина наблюдалось снижение численности представителей *F. prausnitzii* ( $p \leq 0,0017$ ) (рис. 1Б), *A. muciniphila* ( $p \leq 0,0001$ ) (рис. 1Б), представительство бактерий рода *Clostridium* cluster IV ( $p \leq 0,0046$ ) (рис. 1Д) и *Bacteroides+Prevotella*

**Таблица 2. Праймеры для определения уровня экспрессии генов *Foxp3* и *ROR $\gamma$ t* крысы**

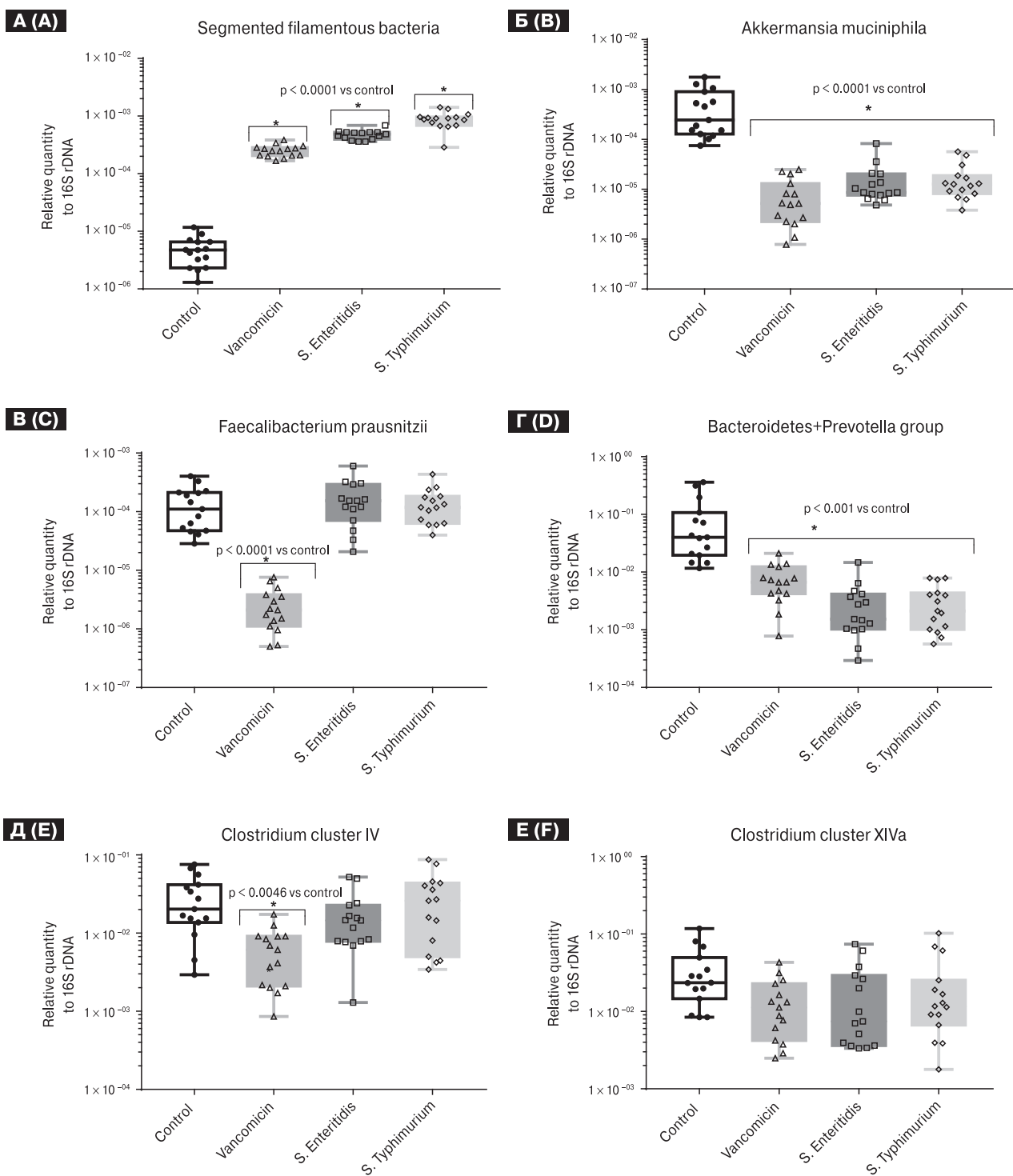
Table 2. Primers for determining the level of gene expression of *Foxp3* and *ROR $\gamma$ t* rats

Ген	Праймер
<i>Foxp3</i>	F = CGAGACTTGAAGTCAGCCAC R = TCTGAGGCAGGCTGGATAACG
<i>ROR<math>\gamma</math>t</i>	F = AACATCTCGGGAGTTGCTGG R = TCGATTTGTGAGGTGTGGGT
GAPDH	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R = GCCTGCTTACCACCTTCT

( $p \leq 0,0005$ ) (рис. 1Г) снижалось менее интенсивно, а уровень *Segmented filamentous bacteria* в этой группе достоверно увеличивался ( $p \leq 0,0001$ ) по сравнению с контролем (рис. 1А). Также при инфицировании крыс *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* в группах III и IV отмечалось уменьшение *A. muciniphila* ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (рис. 1Б) и *Bacteroides+Prevotella* ( $p \leq 0,0002$ ;  $p \leq 0,0002$ ) (рис. 1Г), а количество представителей SFB ( $p \leq 0,0001$ ) (рис. 1А) возрастало по отношению к контрольной группе.

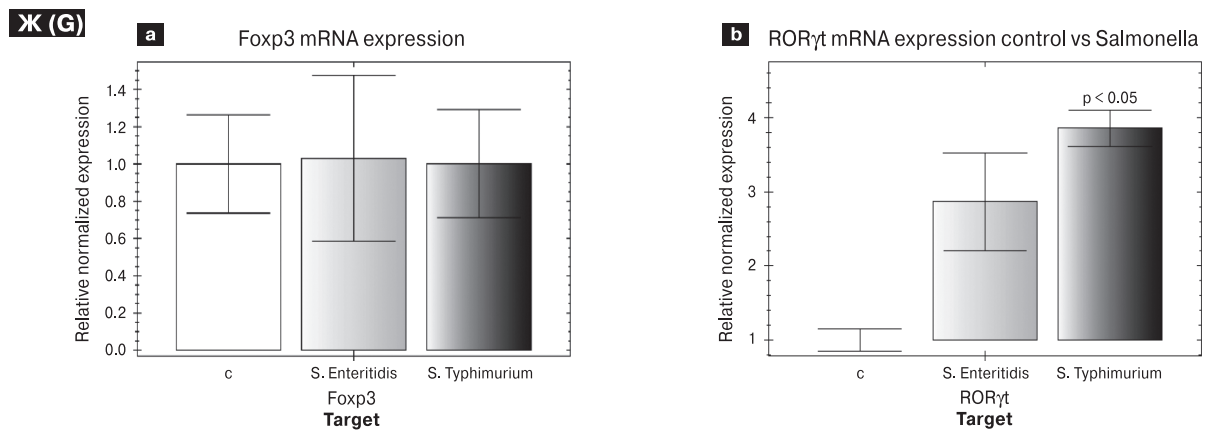
В другом случае, при комбинированном введении ванкомицина и сальмонелл, в пристеночной микробиоте крыс наблюдались более выраженные изменения количественного состава представителей этих родов бактерий. Так, в V и VI экспериментальных группах регистрировалось резкое снижение численности *F. prausnitzii* ( $p \leq 0,0011$ ;  $p \leq 0,0002$ ) (рис. 2В, 3В), *A. muciniphila* ( $p \leq 0,0286$ ;  $p \leq 0,0055$ ) (рис. 2Б, 3Б), *Clostridium* cluster IV ( $p \leq 0,0024$ ;  $p \leq 0,0033$ ) (рис. 2Д, 3Д), *Clostridium* cluster XIV ( $p \leq 0,0127$ ;  $p \leq 0,0198$ ) (рис. 2Е, 3Е) и *Bacteroides+Prevotella* ( $p \leq 0,0189$ ;  $p \leq 0,0017$ ) (рис. 2Г, 3Г), а уровень SFB достоверно увеличивался ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (рис. 2А, 3А) по сравнению с третьей и четвертой группами. Однако при совместном введении ванкомицина, сальмонелл и *B. fragilis* в VII и VIII группах отмечалось интенсивное увеличение количества *Clostridium* cluster IV ( $p \leq 0,0019$ ;  $p \leq 0,0005$ ) (рис. 2Д, 3Д), *Clostridium* cluster XIV ( $p \leq 0,0151$ ;  $p \leq 0,0021$ ) (рис. 2Е, 3Е) и *Bacteroides+Prevotella* ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (рис. 2Г, 3Г). Численность представителей *F. prausnitzii* и *A. muciniphila* достоверно возрастала только в VIII группе ( $p \leq 0,0166$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (рис. 3Б, 3В), а уровень SFB в этих группах достоверно снижался ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (рис. 2А, 3А) по сравнению с контролем (см. табл. 3).

Учитывая, что *B. fragilis* являются одними из основных продуцентов КЦЖК, которые активируют клетки КАЛТ, мы определили уровень экспрессии мРНК транскрипционного фактора *Foxp3*, направляющего дифференцировку Т-клеток в сторону Treg. Так, транскрипционная активность гена *Foxp3* в группах



**Рисунок 1 (1-й фрагмент). Относительное количество представителей *Segmented filamentous bacteria* (А), *Akkermansia muciniphila* (Б), *Faecalibacterium prausnitzii* (В), *Bacteroides+Prevotella* (Г), *Clostridium* cluster IV (Д) и *Clostridium* cluster XIV (Е) по 16S rDNA при введении ванкомицина, *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium***

Figure 1 (fragment 1). The relative number of representatives of *Segmented filamentous bacteria* (A), *Akkermansia muciniphila* (B), *Faecalibacterium prausnitzii* (C), *Bacteroides+Prevotella* (D), *Clostridium* cluster IV (E) и *Clostridium* cluster XIV (F) by 16S rDNA with the introduction of vancomycin, *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*



**Рисунок 1 (2-й фрагмент). Относительное нормализованное количество мРНК генов *Foxp3* (a) и *RORγt* (b) в сгруппированных лимфоидных узелках подвздошной кишки крыс при ведении *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium***

Figure 1 (fragment 2). Relative normalized amount mRNA of *Foxp3* (a) and *RORγt* (b) genes in grouped lymphoid nodules of the ileum of rats when administered by *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*

III, IV и VI оставалась без изменений [рис. 1Ж(a), 2Ж (c1)] и достоверно снижалась в V группе (на 67%,  $p \leq 0,05$ ) [рис. 2Ж (c)]. Однако при введении *B. fragilis* относительное нормализованное количество мРНК гена *Foxp3* в группах Vancomycin+S. Enteritidis+B. fragilis и Vancomycin+S. Typhimurium+B. fragilis увеличилось в 2,5 и 85 раз соответственно ( $p \leq 0,05$ ) [рис. 3Ж (e, e1)]. Увеличение уровня экспрессии транскрипционного фактора *RORγt*, регулирующего дифференцировку субпопуляции Th17-клеток, наблюдалось в III, IV, V и VI группах [рис. 1Ж (b), 2Ж (d, d1)] в 2,9; 3,9; 13 и 2,5 раза и достоверно снижался в VIII группе (на 70%,  $p \leq 0,05$ ) (рис. 3Ж (f1), рис. 4, III обложка).

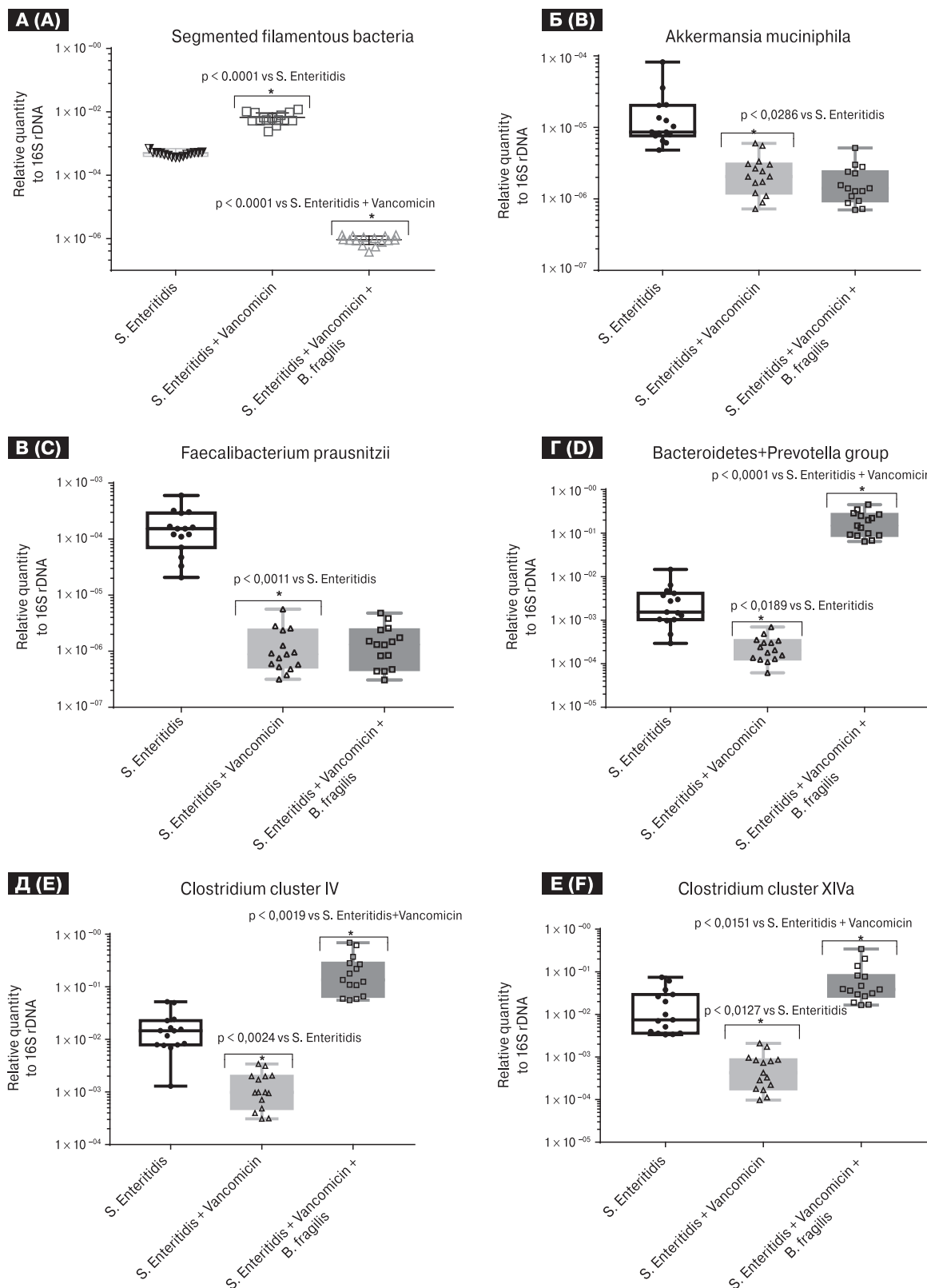
## Обсуждение

Определенные представители кишечной микрофлоры, такие как *Segmented filamentous bacteria*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*, *Clostridium* cluster IV, *Clostridium* cluster XIVa, *Bacteroides fragilis*, способны влиять на активацию врожденных и адаптивных звеньев в КАЛТ, что определяет исход инфекционного заболевания [10, 22].

Существует сложная и динамическая перекрестная связь между кишечной микробиотой и дифференцировкой CD4<sup>+</sup> T-клеток, играющих важную роль в организации адаптивных иммунных реакций в условиях гомеостаза и воспаления. Увеличение продукции Th17-клеток в тонком кишечнике может быть вызвано колонизацией SFB, измененной флорой Шадлера (ASF) и зачастую зависит от количественного содержания кластридий и определенных комменсалов. Почему SFB преимущественно индуцирует дифференцировку Th17?

Два недавних исследования показали, что ключевой особенностью SFB, необходимой для индукции Th17, является тесная связь с эпителиальными клетками кишечника. Используя специфичные для мышей и крыс штаммы SFB, Atarashi и соавт. обнаружили, что только штаммы, полученные от первоначального хозяина, способны индуцировать клетки Th17, что было связано с видоспецифической адгезией. Адгезия SFB индуцировала экспрессию эпителиальных сывороточных амилоидных белков (SAA1/2) и реактивного белка, продуцирующего кислород — Duox2 — в эпителиальных клетках. SAA1 усиливает индукцию IL-17A и IL-17F клетками Th17, а также воздействует на дендритные клетки, способствуя индукции Th17 и повышению экспрессии *RORγt*<sup>+</sup> [4]. Также действие IL-22, канонического цитокина Th17, индуцирует выработку антимикробных пептидов, эффективных против бактерий, способных вызвать присоединение или удаление штаммов, таких как *C. rodentium* и некоторых штаммов *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* [20, 34]. Обнаружено, что колонизация SFB приводит к повышенной экспрессии молекул МНС II класса на эпителиальных клетках кишечника и влияет на гликозилирование энтероцитов, специфически вызывая экспрессию GM1-гликолипидов, предназначенных для ингибирования прикрепления другого агента [41].

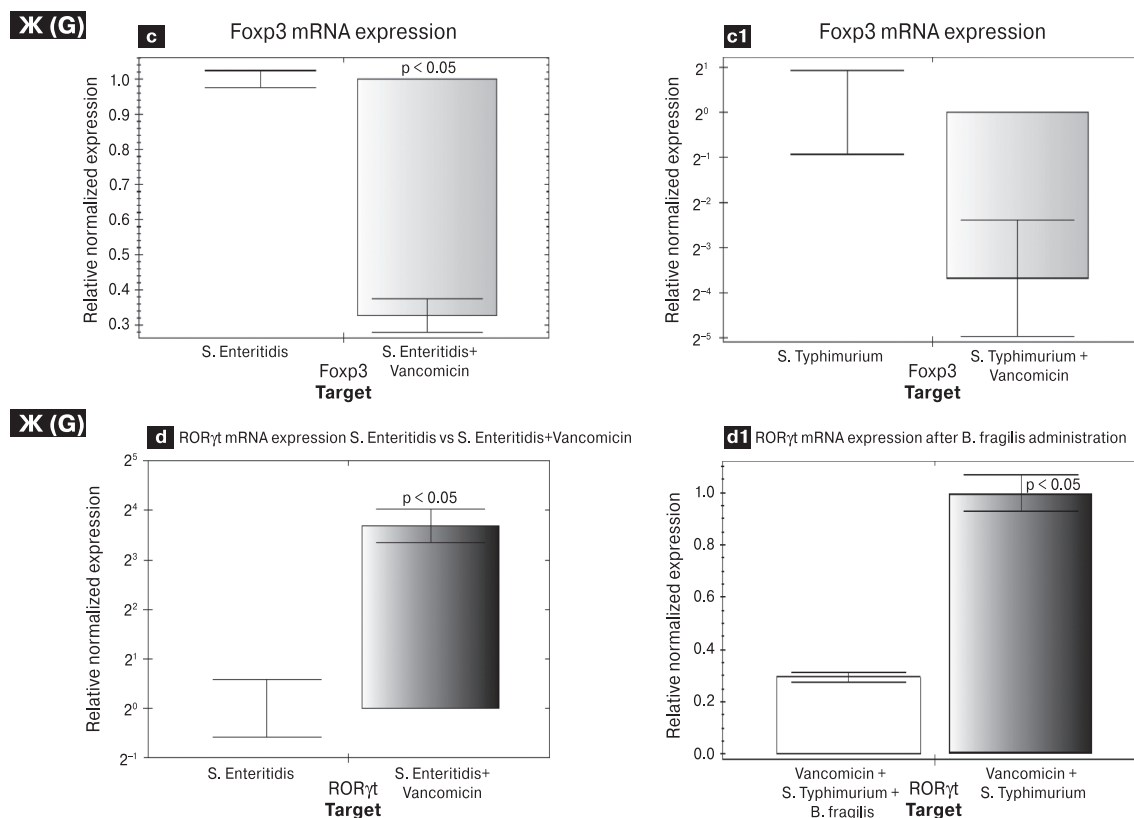
Полученные нами результаты совпадают с данными других экспериментов, демонстрирующих, что колонизация кишечника *Bacteroides fragilis* с помощью его полисахарида А (PSA) индуцирует Tregs и продукцию IL-10 посредством передачи сигналов через TLR2 [17]. Кроме того, бактериальные метаболиты — короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) —



**Рисунок 2 (1-й фрагмент). Относительное число представителей *Segmented filamentous bacteria* (А), *Akkermansia muciniphila* (Б), *Faecalibacterium prausnitzii* (В), *Bacteroides+Prevotella* (Г), *Clostridium* cluster IV (Д) и *Clostridium* cluster XIV (Е) по 16S rDNA при комбинированном ведении ванкомицина, *S. Enteritidis* и *B. fragilis***

Figure 2 (fragment 1). The relative number of representatives of *Segmented filamentous bacteria* (A), *Akkermansia muciniphila* (B), *Faecalibacterium prausnitzii* (C), *Bacteroides+Prevotella* (D), *Clostridium* cluster IV (E) и *Clostridium* cluster XIV (F) by 16S rDNA with the combined management of vancomycin, *S. Enteritidis* и *B. fragilis*





**Рисунок 2 (2-й фрагмент). Относительное нормализованное количество мРНК генов *Foxp3* (c, c1) и *RORγt* (d, d1) в сгруппированных лимфоидных узелках подвздошной кишки крыс при ведении *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином. Нормализация по методу  $\Delta\Delta Ct$  с референс-геном *GAPDH***

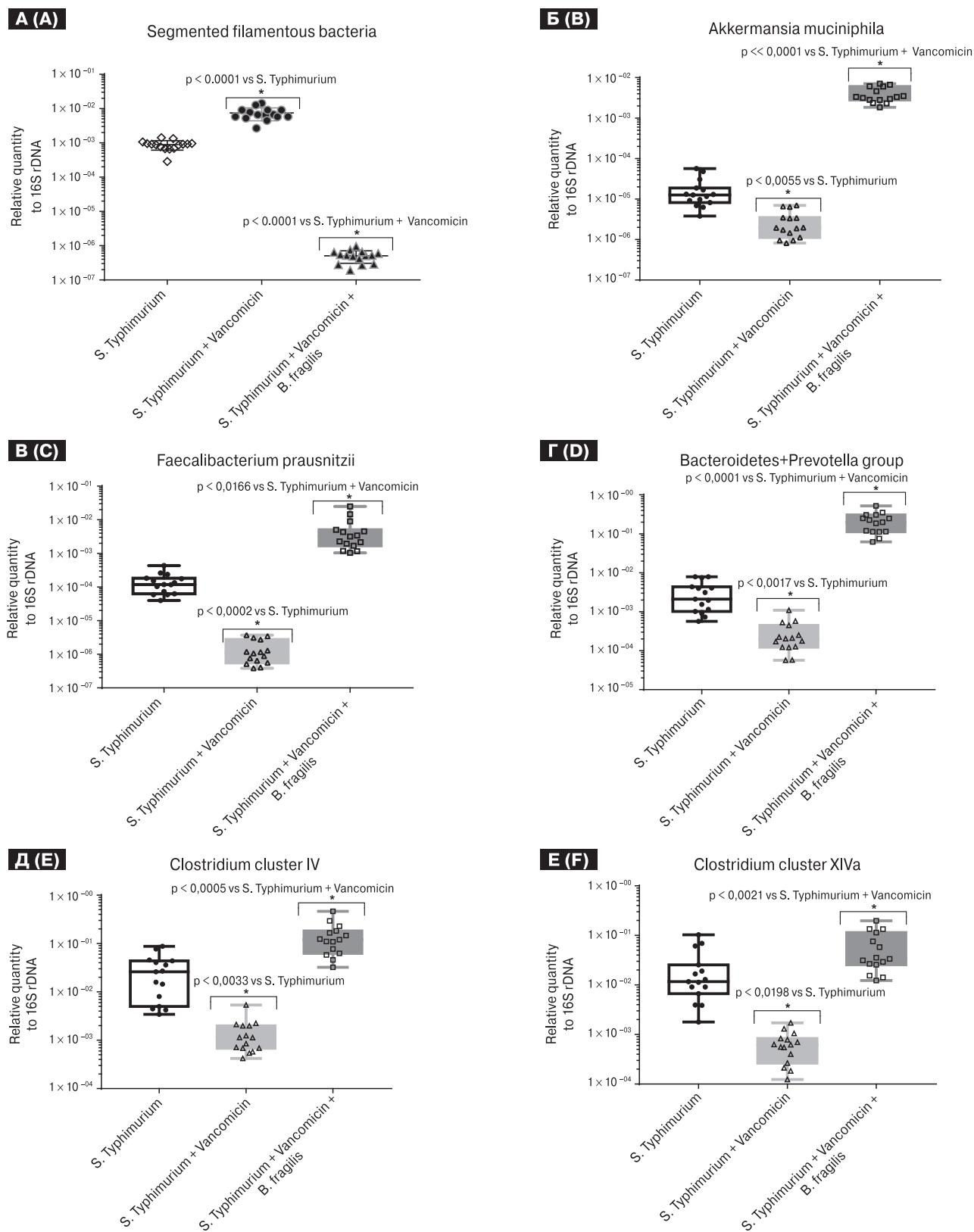
Figure 2 (fragment 2). Relative normalized amount of mRNA *Foxp3* (c, c1) and *RORγt* (d, d1) genes in grouped lymphoid nodules of the ileum of rats when administered by *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* on the background of pre-treatment with vancomycin. Normalization by the  $\Delta\Delta Ct$  method with the *GAPDH* reference gene

также способны регулировать продукцию Tregs клеток и усиливать ацетилирование локуса *Foxp3* в Tregs [33]. При исследовании мышей, колонизированных 17 человеческими штаммами *Clostridium*, уровни содержания КЦЖК (ацетата, пропионата, изобутирата и бутирата) были повышены, что стимулировало продукцию супрессорного цитокина  $TGF\beta$  в эпителиальных клетках толстой кишки и косвенно способствовало развитию Tregs. Рецепторы, которые активируются SCFA, а именно связанные с G-белком (GPCR), такие как *GPR43* (*FFAR2*), экспрессируются как в эпителиальных клетках, так и в большинстве гематопозитических клетках. Соответственно, мыши, лишённые *GPR43*, имели меньшее количество Tregs [3].

Использование очищенного PSA может защитить животных от развития колита и рассеянного склероза. Известно, что *B. fragilis* тесно связывается с криптами кишечника. Когда у *B. fragilis* разрушается PSA, они теряют способность индуцировать Tregs и ассоциировать с кишечным эпителием, что позволяет предположить важность Tregs для колонизации *B. fragilis* в этой

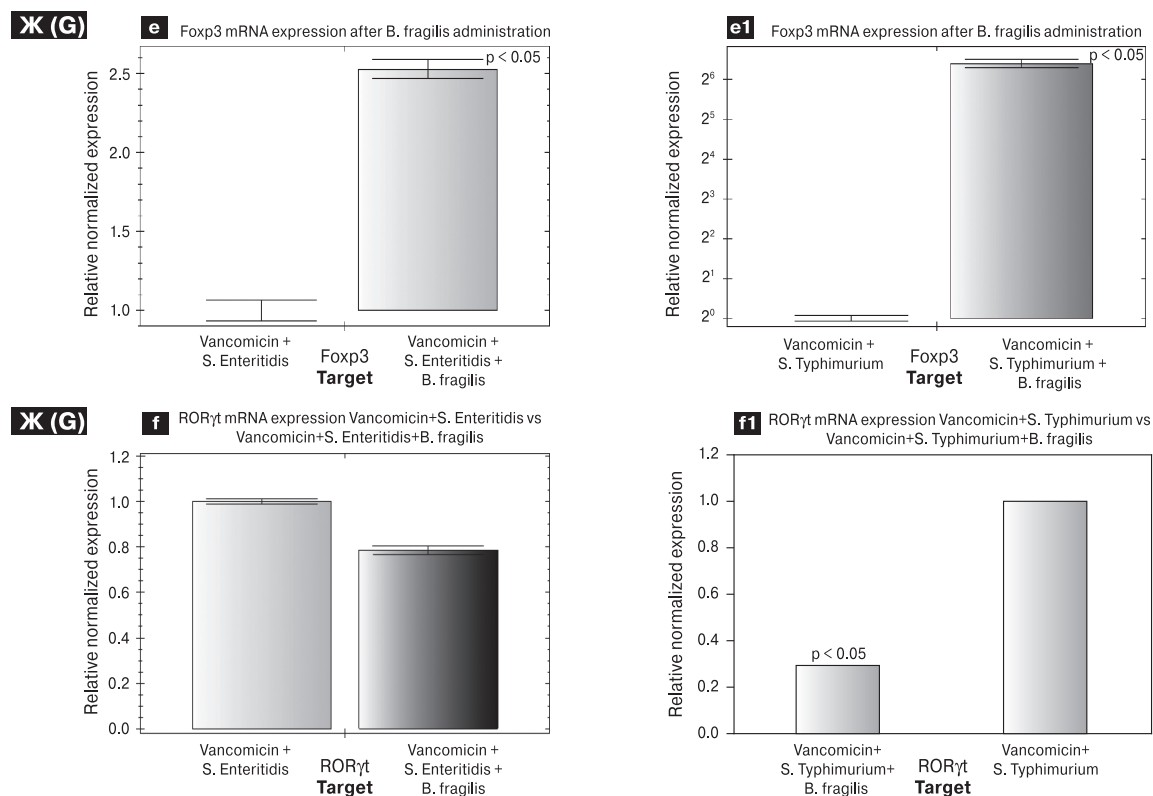
нише. Эффект PSA является примером мощного терапевтического потенциала, который может быть раскрыт посредством детального изучения комменсальных микроорганизмов [14].

В целом комменсалы могут регулировать иммунную специфичность посредством нескольких механизмов: а) микроорганизмы в кишечнике могут индуцировать популяции T-клеток, которые экспрессируют два TCR: один TCR распознает сам комменсал, а другой реагирует на собственный пептид. Миграция этих T-клеток в ткани хозяина может вызвать патологию и аутоиммунитет; б)  $CD4^+$  и  $CD8^+$  T-клетки могут быть активированы независимо от их TCR через Toll-подобные рецепторы (TLR). В частности, стимуляция бактериоидами TLR на T-клетках способствует их дифференцировке в Treg; в) комменсальные микроорганизмы могут экспрессировать эпитопы, имитирующие собственные пептиды, которые, как известно, управляют аутоиммунитетом. Собственные реактивные T-клетки будут активироваться этими антигенами в кишечнике, а затем поступать в ткани и вызывать аутоиммунитет [28].



**Рисунок 3 (1-й фрагмент). Относительное число представителей *Segmented filamentous bacteria* (А), *Akkermansia muciniphila* (Б), *Faecalibacterium prausnitzii* (В), *Bacteroides+Prevotella* (Г), *Clostridium cluster IV* (Д) и *Clostridium cluster XIV* (Е) по 16S rDNA при сочетанном ведении ванкомицина, *S. Typhimurium* и *B. fragilis***

Figure 3 (fragment 1). The relative number of representatives of *Segmented filamentous bacteria* (A), *Akkermansia muciniphila* (B), *Faecalibacterium prausnitzii* (C), *Bacteroides+Prevotella* (D), *Clostridium cluster IV* (E) и *Clostridium cluster XIV* (F) by 16S rDNA with combined management of vancomycin, *S. Typhimurium* and *B. fragilis*



**Рисунок 3 (2-й фрагмент). Относительное нормализованное количество мРНК генов *Foxp3* (e, e1) и *RORγt* (f, f1) в сгруппированных лимфоидных узелках подвздошной кишки крыс при ведении *B. fragilis* экспериментальным животным получавшим *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином. Нормализация по методу  $\Delta\Delta Ct$  с референс-геном *GAPDH***

Figure 3 (fragment 2). Relative normalized amount of mRNA *Foxp3* (e, e1) and *RORγt* (f, f1) genes in grouped lymphoid nodules of the ileum of rats when *B. fragilis* was administered to experimental animals treated with *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* on the background of pre-treatment with vancomycin. Normalization by the  $\Delta\Delta Ct$  method with the *GAPDH* reference gene

Комменсальная микробиота кишечника обеспечивает устойчивость к колонизации патогенными микроорганизмами. Эксперименты показали, что у мышей при заражении *S. Typhimurium* определяется более высокая устойчивость к патогенам, нежели в условиях их предобработки антибиотиком, при которой наблюдается более резкое нарушение резидентного сообщества, что приводит к повышенной инвазии сальмонелл и формированию у людей хронического бессимптомного носительства. Комменсальные виды *Bacteroides* spp. способны ограничивать сальмонелла-индуцированную инфекцию в кишечнике за счет производства КЦЖК, таких как пропионат, ацетат и бутират. Однако сальмонеллы могут избегать реакций врожденного и адаптивного иммунитета посредством продукции эффекторных белков, вызывающих внедрение, выживание и ауторепродукцию бактерий в пределах тканей организма, что приводит к воспалению кишечника [2, 7, 29].

Было обнаружено, что введение живых *A. muciniphila* повышало эндогенную выработ-

ку специфических биологически активных липидов, оказывало противовоспалительное действие и регулировало эндогенную выработку кишечных пептидов, участвующих в регуляции глюкозы и барьерной функции кишечника, а именно глюкагоно-подобных пептидов 1 и 2 (GLP-1 и GLP-2) [11, 21, 24, 35]. Установлено, что высокий уровень метаболитов таких представителей, как *Clostridia*, может способствовать развитию Пейеровых бляшек,  $\alpha\beta$ -TCR интраэпителиальных лимфоцитов (IEL) и продукции IL-7, IL-6, TGF $\beta$ , IgA, а также влиять на соотношение CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> лимфоцитов [32]. Вдобавок *Clostridium* spp. XIV и IV кластеров, посредством активации экспрессии транскрипционного фактора *Foxp3* и IL-10, индуцируют накопление Tregs-клеток в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника, а за счет матричных металлопротеиназ (MMP) активируют TGF- $\beta$  и индоламин 2,3-диоксигеназу (IDO) в эпителиальных клетках толстой кишки и снижают численность Th17, что игра-

**Таблица 3. Количественное определение содержания микроорганизмов в пристеночной микрофлоре крыс по 16S rDNA**  
 Table 3. Quantitative determination of the content of microorganisms in the wall microflora of rats by 16S rDNA

Группы	Segmented filamentous bacteria Candidatus <i>Arthromitus</i> subphylum <i>Clostridium</i>			<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> phylum <i>Firmicutes</i>			<i>Akkermansia muciniphila</i> phylum <i>Verrucomicrobia</i>		
	16S (CT mean)	SFB (CT mean)	2 <sup>-ΔCT</sup>	16S (CT mean)	<i>F. prausnitzii</i> (CT mean)	2 <sup>-ΔCT</sup>	16S (CT mean)	<i>A. muciniphila</i> (CT mean)	2 <sup>-ΔCT</sup>
Control	10,06	27,91	0,000005	9,74	22,93	0,00015	10,17	21,79	0,00051
Vancomycin	10,03	22,02	0,00025*	10,09	28,98	0,000028*	10,17	27,76	0,000083*
<i>S. Enteritidis</i>	9,94	21,0	0,00047*	10,32	23,25	0,00018	10,22	26,57	0,00017*
<i>S. Typhimurium</i>	9,92	20,13	0,00089*	9,96	22,98	0,00015	10,05	26,24	0,00018*
<i>S. Enteritidis</i> +Vancomycin	10,12	17,45	0,0067 <sup>a</sup>	10,28	30,24	0,0000014 <sup>a</sup>	9,95	28,81	0,0000025 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i> +Vancomycin	9,91	17,09	0,0075 <sup>b</sup>	10,24	30,04	0,0000015 <sup>b</sup>	10,20	28,97	0,0000029 <sup>b</sup>
<i>S. Enteritidis</i> +Vancomycin+ <i>B. fragilis</i>	10,01	30,12	0,00000093 <sup>c</sup>	10,05	18,26	0,0068	9,73	17,99	0,0046
<i>S. Typhimurium</i> +Vancomycin+ <i>B. fragilis</i>	10,02	31,05	0,00000051 <sup>d</sup>	9,98	18,20	0,0054 <sup>d</sup>	9,90	18,01	0,0039 <sup>d</sup>
Группы	<i>Clostridium</i> cluster IV ( <i>Clostridium leptum</i> , <i>C. sporosphaeroides</i> , <i>C. cellulosi</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> and <i>Anaerofilum</i> genera)			<i>Clostridium</i> cluster XIV ( <i>Clostridium. coccoides</i> , <i>C. aminovalericum</i> , <i>C. populeti</i> , <i>C. clostridiiforme</i> , <i>C. propionicum</i> , <i>C. neopropionicum</i> , <i>C. lentocellum</i> , <i>C. colinum</i> , <i>C. piliforme</i> , <i>Epulopiscium</i> sp., <i>Eubacterium rectale</i> , <i>E. cellulolyticum</i> , <i>Ruminococcus torques</i> , <i>R. gnavus</i> , <i>Dorea</i> , <i>Lachnospira</i> , <i>Butyrivibrio</i> genera, <i>Acetitomaculum ruminis</i> , <i>Epulopiscium</i> sp., <i>Coproccoccus eutactus</i> , <i>Roseburia cecicola</i> , and <i>Streptococcus hansenii</i> )			<i>Bacteroides</i> + <i>Prevotella</i> <i>Bacteroidetes: Prevotella</i> cluster ( <i>P. melaninogenica</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>P. ruminicola</i> , <i>P. zoogloeiformans</i> , <i>P. heparinolytica</i> ); <i>B. fragilis</i> ; <i>porphyromonas</i> cluster ( <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>P. asaccharolytica</i> , <i>P. circumdentaria</i> , <i>P. salivosa</i> )		
Control	9,96	15,54	0,029	10,02	15,28	0,045	9,83	14,17	0,091
Vancomycin	10,07	17,81	0,0064*	10,10	16,72	0,014	9,71	17,11	0,0077*
<i>S. Enteritidis</i>	10,13	16,44	0,017	9,82	16,33	0,021	9,94	18,93	0,0032*
<i>S. Typhimurium</i>	10,25	16,03	0,029	9,89	16,10	0,024	10,41	19,17	0,0032*
<i>S. Enteritidis</i> +Vancomycin	10,07	19,99	0,0014 <sup>a</sup>	9,88	21,04	0,00065 <sup>a</sup>	10,07	22,27	0,00026 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i> +Vancomycin	10,27	20,07	0,0014 <sup>b</sup>	10,10	20,99	0,00066 <sup>b</sup>	9,96	22,18	0,00029 <sup>b</sup>
<i>S. Enteritidis</i> +Vancomycin+ <i>B. fragilis</i>	10,01	12,65	0,22 <sup>c</sup>	9,53	13,89	0,076 <sup>c</sup>	9,88	12,56	0,187 <sup>c</sup>
<i>S. Typhimurium</i> +Vancomycin+ <i>B. fragilis</i>	9,65	12,75	0,15 <sup>d</sup>	9,33	13,86	0,062 <sup>d</sup>	10,17	12,64	0,212 <sup>d</sup>

**Примечания.** \* Достоверность различий параметров  $p < 0,005$  по отношению к контрольной группе; а — достоверность различий параметров  $p < 0,005$  по отношению к группе *S. Enteritidis*; b — достоверность различий параметров  $p < 0,005$  по отношению к группе *S. Typhimurium*; с — достоверность различий параметров  $p < 0,005$  по отношению к группе *S. Enteritidis* + Vancomycin; d — достоверность различий параметров  $p < 0,005$  по отношению к группе *S. Typhimurium* + Vancomycin.

Notes. \* The reliability of the differences in the parameters  $p < 0,005$  in relation to the control group; a — the reliability of the differences in the parameters  $p < 0,005$  in relation to the group *S. Enteritidis*; b — the reliability of the differences between the parameters  $p < 0,005$  in relation to the group *S. Typhimurium*; c — the reliability of the differences between the parameters  $p < 0,005$  in relation to the group *S. Enteritidis* + Vancomycin; d — the reliability of the differences in the parameters  $p < 0,005$  in relation to the group *S. Typhimurium* + Vancomycin.

ет важную роль в поддержании врожденного и адаптивного иммунного гомеостаза в кишечнике [13, 15, 18, 23, 25, 27].

В целом до настоящего времени было известно, что только некоторые из комменсальных микробов способны модулировать специфические иммунные параметры, но последние работы показывают иммуномодулирующее действие филогенетически все более разнообразных кишечных микробов человека. Большинство бактерий оказывали несколько специализированных, дополнительных или избыточных транскрипционных и иммуномодулирующих эффектов. Удивительно, но зачастую они не зависели от микробной филогении. Эти исследования могут определить важные терапевтические эффекты.

Действительно, скрининг кишечного микробиома дал ряд открытий, как ожидаемых, так и непредвиденных. Например, было обнаружено, что отдельные микроорганизмы способны индуцировать клетки Th17 в эпителии кишечника до уровня, аналогичного уровню, вызываемому SFB, как это было подробно показано в других экспериментах [16]. Однако стало неожиданным наблюдение, что около четверти исследованных бактерий, охватывающих различные виды, могут вызывать индукцию  $ROR\gamma^t$ +Helios-Tregs в толстом кишечнике [38]. Другая, ранее не известная, но потенциально интересная иммуномодулирующая активность представителей *Veillonella* состоит в том, что они стимулируют увеличение IL-10-продуцирующих CD4<sup>+</sup> Т-клеток и параллельное снижение IL-22-продуцирующих эпителиальных клеток в толстой кишке. *L. rhamnosus*, значительно снижает число дендритных клеток, а *F. varium* оказывает необычайно сильную иммуностимулирующую активность [5].

## Выводы

Введение животным ванкомицина и сальмонелл обуславливало количественное изменение уровня ключевых иммунорегуляторных бактерий: увеличение уровня SFB и существенное уменьшение *A. muciniphila*, *F. prausnitzii*. При инфицировании крыс *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином наблюдалось более резкое изменение в количественном составе микробиоты, приводящее к уменьшению уровня экспрессии мРНК генов *Foxp3*<sup>+</sup> и увеличению  $ROR\gamma^t$  соответственно. Однако введение экспериментальным животным *B. fragilis*, получавшим *S. Enteritidis* или *S. Typhimurium* на фоне предобработки ванкомицином, уменьшало уровни SFB и мРНК  $ROR\gamma^t$ , а также значительно увеличивало представительство *Bacteroides*–*Prevotella* group, *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. кластеров XIV, IV, *F. prausnitzii* и экспрессии генов *Foxp3*<sup>+</sup>, что свидетельствует о восстановлении гомеостаза кишечного микробиома.

Изучение молекулярных механизмов взаимодействия SFB с КАЛТ позволяет выяснить их влияние на физиологические, метаболические и иммунные процессы в кишечнике и, возможно, использовать *A. muciniphila*, *Clostridium* spp. кластеров XIV и IV, *F. prausnitzii* и *Bacteroides*–*Prevotella* group в качестве инструмента для разработки новых методов профилактики и терапии воспалительных заболеваний кишечника или заболеваний с нарушением барьерной функции кишечника.

*B. fragilis* снижает дисбиотические проявления, способствует восстановлению кишечного микробиома и может применяться как общая адьювантная терапия в сочетании с антибактериальными препаратами.

## Список литературы/References

1. Букина Ю.В., Камышный А.М., Полищук Н.Н., Топол И.А. Сальмонелла-индуцированные изменения кишечной микробиоты и транскриптома генов иммунного ответа на фоне введения ванкомицина и *Bacteroides fragilis* // Патология. 2017. Т. 14, № 1 (39). С. 12–19. [Bukina Y.V., Kamyshnyi A.M., Polishchuk N.N., Topol I.A. Salmonella-induced changes in the gut microbiota and immune response genes transcriptome during administration of vancomycin and *Bacteroides fragilis*. *Patologiya = Pathology*, 2017, vol. 14, no. 1 (39), pp. 12–19. (In Russ.)]
2. Agbor T.A., McCormick B.A. Salmonella effectors: important players modulating host cell function during infection. *Cell Microbiol.*, 2011, vol. 13, pp. 1858–1869. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01701.x
3. Arpaia N., Campbell C., Fan X. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 2013, vol. 504, pp. 451–455. doi: 10.1038/nature12726
4. Atarashi K., Tanoue T., Ando M., Kamada N., Nagano Y. Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells. *Cell*, 2015, vol. 163, pp. 367–380. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.058
5. Atarashi K., Tanoue T., Oshima K., Suda W., Nagano Y., Nishikawa H., Fukuda S., Saito T., Narushima S., Hase K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, 2013, vol. 500, pp. 232–236. doi: 10.1038/nature12331
6. 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, vol. 331, pp. 337–341. doi: 10.1126/science.1198469
7. Behnsen J., Perez-Lopez A., Nuccio S.P., Raffatellu M. Exploiting host immunity: the Salmonella paradigm. *Trends Immunol.*, 2015, vol. 36, pp. 112–120. doi: 10.1016/j.it.2014.12.003

8. Breyner N.M., Michon C., de Sousa C.S., Vilas Boas P.B., Chain F., Azevedo V.A., Langella P., Chatel J.M. Microbial anti-inflammatory molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* shows a protective effect on DNBS and DSS-induced colitis model in mice through inhibition of NF- $\kappa$ B pathway. *Front. Microbiol.*, 2017, vol. 8: 114. doi: 10.3389/fmicb.2017.00114
9. Bukina Yu.V., Varynskiy B.O., Voitovich A.V., Koval G.D., Kaplaushenko A.G., Kamyshnyi O.M. The definition of neutrophil extracellular traps and the concentration of short-chain fatty acids in salmonella-induced inflammation of the intestine against the background of vancomycin and *bacteroides fragilis*. *Pathology*, 2018, vol. 15, no. 1 (42), pp. 10–17.
10. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 2014, vol. 505, pp. 559–563. doi: 10.1038/nature12820
11. Dubourg G., Lagier J.C., Armougom F., Robert C., Audoly G., Papazian L. High-level colonisation of the human gut by *Verrucomicrobia* following broad-spectrum antibiotic treatment. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2013, vol. 41, pp. 149–155. doi: 10.1371/journal.pone.0095476
12. Ferreira-Halder C.V., Faria A.V.S., Andrade S.S. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2017, vol. 6, pp. 643–648. doi: 10.1016/j.bpg.2017.09.011
13. Feuerer M., Hill J.A., Kretschmer K., von Boehmer H., Mathis D., Benoist C. Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes. *Proc. Natl. Acad. Science USA*, 2010, vol. 107, pp. 5919–5924. doi: 10.1073/pnas.1002006107
14. Furusawa Y., Obata Y., Fukuda S. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 2013, vol. 504, pp. 446–450. doi: 10.1038/nature12721
15. Geuking M.B., Cahenzli J., Lawson M.A., Ng D.C., Slack E., Hapfelmeier S., McCoy K.D., Macpherson A.J. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*, 2011, vol. 34, pp. 794–806. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.021
16. Geva-Zatorsky N., Sefik E., Kua L., Pasmán L., Tan T.G., Ortiz-Lopez A., Yanortsang T.B., Yang L., Jupp R., Mathis D., Benoist C., Kasper D.L. Mining the human gut microbiota for immunomodulatory organisms. *Cell*, 2017, vol. 168, no. 5, pp. 928–943. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.022
17. Goto Y., Umesaki Y., Benno Y., Kiyono H. Epithelial glycosylation in gut homeostasis and inflammation. *Nat. Immunol.*, 2016, vol. 17, no. 11, pp. 1244–1251. doi: 10.1038/ni.3587
18. Honda K., Littman D.R. The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012, vol. 30, pp. 759–795. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074937
19. Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 2012, vol. 336, no. 6086, pp. 1268–1273. doi: 10.1126/science.1223490
20. 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, vol. 139, pp. 485–498. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033
21. Keestra-Gounder A.M., Tsohis R.M., Bäumlér A.J. Now you see me, now you don't: the interaction of *Salmonella* with innate immune receptors. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, vol. 13, pp. 206–216. doi: 10.1038/nrmicro3428
22. Korpela K., Flint H.J., Johnstone A.M., Lappi J., Poutanen K., Dewulf E. Gut microbiota signatures predict host and microbiota responses to dietary interventions in obese individuals. *PLoS One*, 2014, vol. 9 (6): e90702. doi: 10.1371/journal.pone.0090702
23. Lathrop S.K., Bloom S.M., Rao S.M., Nutsch K., Lio C.W., Santacruz N., Peterson D.A., Stappenbeck T.S., Hsieh C.S. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*, 2011, vol. 478, pp. 250–254. doi: 10.1038/nature10434
24. Li J., Lin S., Vanhoutte P.M., Woo C.W., Xu A. *Akkermansia muciniphila* protects against atherosclerosis by preventing metabolic endotoxemia-induced inflammation in apoe<sup>-/-</sup> mice. *Circulation*, 2016, vol. 133, pp. 2434–2446. doi: 10.1038/nature10434
25. Littman D.R., Rudenski A.Y. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, 2010, vol. 140, pp. 845–858. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.021
26. Lopetuso L.R., Scalfaferrri F., Petito V., Gasbarrini A. Commensal *Clostridia*: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog.*, 2013, vol. 5 (1): 23. doi: 10.1186/1757-4749-5-23
27. Nagano Y., Itoh K., Honda K. The induction of Treg cells by gut-indigenous *Clostridium*. *Curr. Opin. Immunol.*, 2012, vol. 24, pp. 392–397. doi: 10.1016/j.coi.2012.05.007
28. Ochoa-Reparaz J., Mielcarz D.W., Wang Y., Begum-Haque S., Dasgupta S. A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol.*, 2010, vol. 3, pp. 487–495. doi: 10.1038/mi.2010.29
29. Ost K.S., Round J.L. Communication between the microbiota and mammalian immunity. *Annu. Microbiol. Rev.*, 2018, vol. 72, pp. 399–422. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062307
30. Pickard J.M., Zeng M.Y., Caruso R., Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol. Rev.*, 2017, vol. 279, no. 1, pp. 70–89. doi: 10.1111/immr.12567
31. Plovier H., Everard A., Druart C., Depommier C., Van Hul M., Geurts L., Chilloux J., Ottman N., Duparc T., Lichtenstein L., Myridakis A., Delzenne N.M., Klievink J., Bhattacharjee A., van der Ark K.C., Aalvink S., Martínez L.O., Dumas M.E., Maiter D., Loumaye A., Hermans M.P., Thissen J.P., Belzer C., de Vos W.M., Cani P.D. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat. Med.*, 2017, vol. 1, pp. 107–113. doi: 10.1038/nm.4236
32. Quevrain E., Maubert M.A., Michon C., Chain F., Marquant R. Identification of an antiinflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut*, 2016, vol. 65, pp. 415–425. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307649
33. Round J.L., Mazmanian S.K. Inducible Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Science USA*, 2010, vol. 107, pp. 12204–12209. doi: 10.1073/pnas.0909122107
34. Sano T., Huang W., Hall J.A., Yang Y., Chen A. An IL-23R/IL-22 circuit regulates epithelial serum amyloid A to promote local effector Th17 responses. *Cell*, 2015, vol. 163, pp. 381–393. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.061

35. Shin N.R., Lee J.C., Lee H.Y., Kim M.S., Whon T.W., Lee M.S. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, 2014, vol. 63, pp. 727–735. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303839
36. Smith P.M., Howitt M.R., Panikov N. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 2013, vol. 341, no. 6145, pp. 569–573. doi: 10.1126/science.1241165
37. Sorini C., Cardoso R.F., Gagliani N., Villablanca E.J. Commensal bacteria-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in health and disease. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9: 2667. doi: 10.3389/fimmu.2018.02667
38. Tan T.G., Sefik E., Geva-Zatorsky N., Kua L., Naskar D., Teng F., Pasmán L., Ortiz-Lopez A., Jupp R., Wu H.J. Identifying species of symbiotic bacteria from the human gut that, alone, can induce intestinal Th17 cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016, vol. 113, pp. 8141–8150. doi: 10.1073/pnas.1617460113
39. Telesford K.M., Yan W., Ochoa-Reparaz J., Pant A., Kircher C., Christy M.A., Begum-Haque S., Kasper D.L., Kasper L.H. A commensal symbiotic factor derived from *Bacteroides fragilis* promotes human CD39(+)Foxp3(+) T cells and Treg function. *Gut Microbes.*, 2015, vol. 6, pp. 234–242. doi: 10.1080/19490976.2015.1056973
40. Yang Y., Torchinsky M.B., Gobert M., Xiong H., Xu M. Focused specificity of intestinal TH17 cells towards commensal bacterial antigens. *Nature*, 2014, vol. 510, pp. 152–156. doi: 10.1038/nature13279
41. Zheng Y., Valdez P.A., Danilenko D.M., Hu Y., Sa S.M., Gong Q., Abbas A.R., Modrusan Z., Ghilardi N., de Sauvage F.J., Ouyang W. Interleukin 22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.*, 2008, vol. 14, pp. 282–289. doi: 10.1038/nm1720
42. Zhou L., Zhang M., Wang Y., Dorfman R.G., Liu H., Yu T., Chen X., Tang D., Xu L., Yin Y., Pan Y., Zhou Q., Zhou Y., Yu C. *Faecalibacterium prausnitzii* Produces butyrate to maintain Th17/Treg balance and to ameliorate colorectal colitis by inhibiting histone deacetylase. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2018, vol. 24, iss. 9, pp. 1926–1940. doi: 10.1093/ibd/izy182

**Авторы:**

**Букина Ю.В.**, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Запорожского государственного медицинского университета, г. Запорожье, Украина;

**Федонюк Л.Я.**, д.м.н., профессор, зав. кафедры медицинской биологии Тернопольского государственного медицинского университета им. И.Я. Горбачевского, г. Тернополь, Украина;

**Коваль Г.Д.**, д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и эндокринологии Буковинского государственного медицинского университета, г. Черновцы, Украина;

**Шеховцова Ю.А.**, к.м.н., ассистент кафедры внутренней медицины и эндоскопии Харьковского национального медицинского университета, г. Харьков, Украина;

**Камышный А.М.**, д.м.н., профессор, зав. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Запорожского государственного медицинского университета, г. Запорожье, Украина;

**Губарь А.А.**, к.м.н., доцент кафедры урологии Запорожского государственного медицинского университета, г. Запорожье, Украина;

**Губка В.А.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры госпитальной хирургии Запорожского государственного медицинского университета, г. Запорожье, Украина.

**Authors:**

**Bukina Yu.V.**, Assistant Professor, Microbiology, Virology and Immunology Department, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine;

**Fedoniuk L.Ya.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Medical Biology Department, Gorbachevskij Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine;

**Koval G.D.**, PhD, MD (Medicine), Professor of Clinical Immunology, Allergology and Endocrinology Department, Bukovinian State Medical University, Chernovtsy, Ukraine;

**Shekhovtsova Iu.O.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Internal Medicine and Endocrinology, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine;

**Kamyshnyi A.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Microbiology, Virology and Immunology Department, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine;

**Gubar A.O.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Urology Department, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine;

**Gubka V.O.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor of Hospital Surgery Department, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine.

Поступила в редакцию 18.02.2019  
Принята к печати 20.05.2020

Received 18.02.2019  
Accepted 20.05.2020