

СОСТАВ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА И ПОПУЛЯЦИЙ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ Th-КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

И.Н. Абдурасулова^{1,2}, Е.А. Тарасова¹, И.В. Кудрявцев^{1,3}, И.Г. Негореева⁴,
А.Г. Ильвес⁴, М.К. Серебрякова¹, Е.И. Ермоленко^{1,5}, Е.В. Ивашкова⁴,
А.В. Мацулевич¹, А.Е. Татарин¹, И.Д. Столяров⁴, В.М. Клименко¹,
А.Н. Суворов^{1,5}

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В настоящее время роль микробиоты кишечника активно изучается при многих заболеваниях центральной нервной системы (ЦНС), в том числе при рассеянном склерозе (РС). В патогенезе РС ключевую роль играют аутореактивные к антигенам миелина CD4⁺ Th1- и Th17-клетки. Учитывая патогенетические особенности рассматриваемого аутоиммунного заболевания в данном исследовании уделено внимание анализу связи микробиоценоза кишечника с различными субпопуляциями Th-клеток. Цель исследования — оценить уровни отдельных представителей микробиоты кишечника у пациентов с РС и сопоставить их с уровнем циркулирующих в крови субпопуляций Th. В исследовании у 112 (72 женщины и 40 мужчин) пациентов с РС разной тяжести и длительности заболевания бактериологическим методом и с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени оценен уровень симбиотических и оппортунистических видов микроорганизмов. Субпопуляции Th-клеток (Th1, Th2, Th17, Th1/Th17, Th17/Th22, DP Th17), различающиеся набором хемокиновых рецепторов, определяли методом проточной цитофлуориметрии. Показана связь отдельных представителей микробиоты кишечника с тяжестью, длительностью и скоростью прогрессирования заболевания, а также с фенотипами иммунных клеток. Наибольшая связь уровня циркулирующих иммунных клеток наблюдалась с уровнем *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. и *Enterobacter* spp., причем действие *Enterococcus* spp. на субпопуляции Th клеток было синергично с действием *Enterobacter* spp. и антагонистично с *Lactobacillus* spp. Мы предполагаем, что выявление механизмов прямого и опосредованного влияния микробиоты на иммунную систему в дальнейшем будет способствовать разработке принципиально новых стратегий терапии РС.

Ключевые слова: рассеянный склероз, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, дисбиоз, кишечная микробиота, иммунорегуляция, T-хелперы, DP Th17.

Адрес для переписки:

Абдурасулова Ирина Николаевна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-94-75 (служебн.).
E-mail: i_abdurasulova@mail.ru

Contacts:

Irina N. Abdurasulova
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika Pavlova str., 12,
Scientific Research Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-94-75 (office).
E-mail: i_abdurasulova@mail.ru

Библиографическое описание:

Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Кудрявцев И.В., Негореева И.Г.,
Ильвес А.Г., Серебрякова М.К., Ермоленко Е.И., Ивашкова Е.В.,
Мацулевич А.В., Татарин А.Е., Столяров И.Д., Клименко В.М.,
Суворов А.Н. Состав микробиоты кишечника и популяций
циркулирующих Th-клеток у пациентов с рассеянным
склерозом // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 504–522.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-504-522

© Абдурасулова И.Н. и соавт., 2019

Citation:

Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Kudryavtsev I.V., Negoreeva I.G., Ilves A.G.,
Serebryakova M.K., Ermolenko E.I., Ivashkova E.V., Matsulevich A.V.,
Tatarinov A.E., Stoliarov I.D., Klimenko V.M., Suvorov A.N. Intestinal
microbiota composition and peripheral blood Th cell subsets in patients with
multiple sclerosis// Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2019, vol. 9, no. 3–4, pp. 504–522. doi: 10.15789/2220-7619-
2019-3-4-504-522

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-504-522>

INTESTINAL MICROBIOTA COMPOSITION AND PERIPHERAL BLOOD Th CELL SUBSETS IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Abdurasulova I.N.^{a,b}, Tarasova E.A.^a, Kudryavtsev I.V.^{a,c}, Negoreeva I.G.^d, Ilves A.G.^d, Serebryakova M.K.^a, Ermolenko E.I.^{a,e}, Ivashkova E.V.^d, Matsulevich A.V.^a, Tatarinov A.E.^a, Stoliarov I.D.^d, Klimentko V.M.^a, Suvorov A.N.^{a,e}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^c Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^d Institute of the Human Brain RAS, St. Petersburg, Russian Federation

^e St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. At present, the role of intestinal microbiota in diverse diseases of the central nervous system, including of multiple sclerosis (MS) has been extensively investigated. Self-reactive CD4⁺ Th1 and Th17 cells specific to myelin-derived antigens play a key role in the MS pathogenesis. Taking into consideration pathogenetic features related to MS development, we examined a relation between intestinal microbiocenosis and abundance of various peripheral blood helper T (Th) cell subsets in MS patients. Objective of the study: to assess prevalence of individual members of the intestinal microbiota in MS patients and analyze a relation with peripheral blood Th cell subsets. Prevalence of symbiotic and opportunistic microbial species was estimated by bacteriological method and real time PCR in 112 MS patients (72 females, 40 males) of varying severity and duration. Th cell subsets (Th1, Th2, Th17, Th1/Th17, Th17/Th22, DP Th17) were analyzed by using multi-color flow cytometry based on Th cell subset-specific surface expression of chemokine receptors. A relationship between individual intestinal microbiota species and severity, duration and rate of MS progression, as well as with the phenotype of immune cells was assessed. It was found that the most significant correlation between percentage of peripheral blood Th cell subsets was observed with prevalence of *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. and *Enterobacter* spp. Moreover, prevalence of *Enterococcus* spp. Th cell composition influenced synergistically or antagonistically together with *Enterobacter* spp. or *Lactobacillus* spp., respectively. It is suggested that direct and indirect impact of intestinal microbiota composition on human immune system might contribute to developing novel strategies for treating MS.

Key words: multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, dysbiosis, intestinal microbiota, immunoregulation, Th cell, DP Th17.

Введение

Рассеянный склероз (РС) является аутоиммунным демиелинизирующим заболеванием центральной нервной системы (ЦНС), поражающим людей трудоспособного возраста. В патогенезе РС ключевую роль играют аутореактивные к антигенам миелина CD4⁺ Th1- и Th17-клетки [25, 55]. В норме Th1 обеспечивают защиту от внутриклеточных бактерий и вирусов, а Th17-клетки — представляет первую линию защиты организма от внеклеточных патогенов (бактерий и грибов) [11], однако при их дисрегуляции отмечаются различные иммунопатологические состояния.

После того как было выяснено, что для запуска экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) — модели РС у животных — требуется интерлейкин (IL)-23, а не IL-12 [27], было высказано предположение о большей патогенной роли при РС именно Th17-клеток. Th17-клетки присутствуют в очагах воспаления в ЦНС пациентов с РС [59], их количество увеличивается в крови и ликворе пациентов с активным РС, а также при рецидивах [31], напротив, супрессия их дифференцировки у животных ослабляет тяжесть ЭАЭ [43, 78]. Существуют данные о том, что основным патогенетическим звеном при ЭАЭ/РС являются Th17-клетки, продуцирующие цитокины семейства IL-17 [21, 45, 73], и сообщения о роли IL-6, TNF α , IL-21, IL-22 и GM-CSF в развитии РС [52].

Th17 — гетерогенная популяция клеток, различающаяся продуцируемыми цитокинами семейства IL-17 и поверхностными рецепторами. [52]. Кроме характерного рецептора CCR6, Th17-клетки экспрессируют на своей поверхности другие хемокиновые рецепторы, по комбинации которых они классифицируются на 4 субпопуляции [51].

В настоящее время, кроме классических Th17 (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻), выделяют также неклассические клетки Th1/Th17 или Th17.1 (CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁺), которые способны продуцировать одновременно IL-17A и IFN γ [75]. Большинство функциональных характеристик Th17-клеток обладают также клетки с фенотипом CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺, получившие название «дважды позитивных» или DP Th17. Эти клетки имеют свойства одновременно Th17- и Th1-клеток, хотя их способность к продукции IFN γ и GM-CSF существенно ниже, чем у субпопуляции Th1/Th17 [63]. Существуют также двойные негативные Th17-клетки (CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁻) [51], и в качестве отдельного подтипа Th17-клеток рассматривается субпопуляция, коэкспрессирующая на поверхности CCR4 и CCR10, так называемые Th17/Th22 [68].

На сегодняшний день не ясно, являются ли эти субпопуляции отдельными клонами клеток или представляют разные стадии дифференцировки единого предшественника, неизвестна также роль этих субпопуляций при РС. Предполагается, что отдельные субпопуляции

Th17 клеток играют разную роль в зависимости от окружающей воспалительной среды, определяемой составом цитокинов, а миграцию в зону воспаления обеспечивает уникальный паттерн экспрессии рецепторов хемокинов [12].

Известно, что разные типы иммунного ответа могут активироваться микроорганизмами, населяющими кишечник. Например, дифференцировке Th17 способствуют некоторые представители кишечной микробиоты, в частности, сегментированные филаментные бактерии (*segmented filamentous bacteria*, SFB) [35, 39, 40]. Причем при стимуляции разными видами микроорганизмов, образовавшиеся Th17-клетки продуцируют различный спектр цитокинов. Так, Th17-клетки, имеющие рецепторы, распознающие *Candida albicans*, могут продуцировать IL-17 и IFN γ , но не IL-10, тогда как Th17-клетки, распознающие *Staphylococcus aureus*, продуцируют IL-17 и могут продуцировать IL-10 при рестимуляции [79].

Образование Th1-клеток стимулируется многими патогенными бактериями [34]. Выявлены также виды бактерий, влияющие на образование регуляторных T-лимфоцитов (Treg), среди которых прежде всего следует отметить *Bacteroides* spp. и *Faecalibacterium prausnitzii* [14, 66]. Неудивительно, что именно в кишечнике сосредоточено наибольшее количество как iTreg, так и Th17 [53].

Учитывая влияние кишечной микробиоты на иммунные функции, в настоящее время активно обсуждается ее роль в патогенезе РС [37, 56]. Этому также способствует ряд исследований, указывающих на вовлечение кишечной микробиоты в развитие ЭАЭ у животных [19, 46]. После колонизации кишечника GF M0G₉₂₋₁₀₆ TCR трансгенных мышей микробиотой от пациентов с РС, у них в большем числе случаев развивался ЭАЭ, чем у мышей, колонизированных микробиотой от здоровых лиц [20]. Развитие ЭАЭ у животных сопровождалось фазовыми изменениями качественного и количественного состава кишечной микробиоты, и микробиоценоз кишечника различался у животных с разной тяжестью ЭАЭ [2].

Использование пероральных препаратов в современной патогенетической терапии сопровождается клинически значимыми побочными эффектами со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Можно предположить, что в их развитии определенную роль играют изменения состава микробиоты кишечника. В ряде исследований выявлены отличия состава микробиоты кишечника пациентов с РС от здоровых лиц, которые характеризуются как дисбиоз [1, 24, 41, 58], что согласуется с наличием у 70–90% больных РС нарушений функций ЖКТ [1, 47].

Показано, что специфические изменения состава микробиоты у пациентов с ремитирующим течением РС (PP-PC) связаны с селективным увеличением эффекторных Th17 клеток в слизистой оболочке тонкой кишки [26] и специфическими иммунными маркерами на лимфоцитах периферической крови [41, 72]. Однако этих данных пока недостаточно, чтобы сделать определенные выводы об этой связи.

Цель данной работы — оценить уровни отдельных представителей микробиоты кишечника у пациентов с РС и сопоставить их с уровнем циркулирующих в крови субпопуляций Th.

Материалы и методы

Пациенты. В исследовании приняли участие 112 пациентов с диагнозом «рассеянный склероз», 72 женщины (43,3±1,3 лет) и 40 мужчин (39,7±1,8 лет). Характеристика пациентов представлена в таблице 1. Пациенты наблюдались в ФГБУН ИМЧ им. Н.П. Бехтерева РАН и клинике ФГБНУ «ИЭМ» (Санкт-Петербург). Все пациенты подписали информированное согласие и на момент исследования находились в стадии ремиссии.

Контрольную группу в иммунологических исследованиях составили условно-здоровые доноры в количестве 30 человек, соответствующего с пациентами возраста и в той же пропорции по полу.

Исследование состава микробиоты кишечника. Состав просветной микробиоты кишечника пациентов определяли в образцах фекалий в день забора материала. Исследование проводили двумя методами, как было описано ранее: бактериологическим [32] и при помощи полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [1]. Для проведения ПЦР-РВ из фекалий выделяли ДНК с помощью набора ДНК-ЭКСПРЕСС (Литех, Россия), а затем использовали набор «Колонофлор-16» (ООО «АльфаЛаб», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Кроме того, у 61 пациента методом ПЦР определяли следующие микроорганизмы: *Roseburia* spp., *Akkermansia muciniphila*, *Sutterella wadsworthensis*, *Prevotella* spp., *Ruminococcus* spp. Для выявления каждого микроорганизма проводили 40 циклов амплификации со специфическими ДНК-праймерами. Последовательности праймеров и условия проведения ПЦР представлены в таблице 2.

Исследование фенотипов иммунных клеток. Фенотипы иммунных клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии в венозной крови, полученной путем пункции периферической вены и собранной в вакуумные пробирки с добавлением КЗ ЭДТА. Образцы крови были взяты в тот же день, что и образцы

Таблица 1. Характеристика пациентов

Table 1. Patient characteristics

| Показатель Parameter | | Пол Sex | Женщины Females | Мужчины Males | Всего Total |
|---|----------------------|------------|--------------------|------------------|----------------|
| Возраст (лет)/Age (years) | | | 43,3±1,3 | 39,7±1,8 | 42,0±1,1 |
| Длительность заболевания — ДЗ (лет), M±m Duration of disease — DD (years), M±m | | | 12,5±1,0 | 10,6±1,2 | 11,9±0,8 |
| Доля пациентов с разной ДЗ, % Proportion of patients with varying DD, % | < 5 лет/years | | 20,0 | 20,0 | 20,0 |
| | 5–10 лет/years | | 27,1 | 30,0 | 28,2 |
| | 11–15 лет/years | | 20,0 | 17,5 | 19,1 |
| | > 16 лет/years | | 32,9 | 32,5 | 32,7 |
| EDSS (баллы), M±m/EDSS score, M±m | | | 3,5±0,2 | 3,4±0,3 | 3,5±0,1 |
| Доля пациентов с разным EDSS, % Proportion of patients with different EDSS, % | < 3,0 баллов/score | | 46,5 | 60,0 | 51,4 |
| | > 3,5 баллов/score | | 53,5 | 40,0 | 48,6 |
| Скорость прогрессирования РС (EDSS/ДЗ), M±m Rate of MS progression (EDSS/DD), M±m | | | 0,37±0,03 | 0,48±0,07 | 0,41±0,03 |
| Доля пациентов с разной скоростью прогрессирования РС, % Proportion of patients with varying rate of MS progression, % | < 0,5 (низкая/low) | | 78,1 | 72,2 | 76,0 |
| | > 0,5 (высокая/high) | | 21,9 | 27,8 | 24,0 |
| Количество (чел.)/Total patients | | | 72 | 40 | 112 |

фекалий и исследовались в день взятия крови. Пробоподготовку и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными ранее [8]. Для выявления популяций Th использовали антитела против CD3 (клон UCNT1) и CD4 (клон 13B8.2), для разделения CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов на отдельные субпопуляции — антитела против CD45RA [клон 2H4LDH11LDB9 (2H4)] и CD62L (клон DREG56) с применением тактики «гейтирования», детально описанной ранее [6, 7].

Субпопуляция «наивных» Th обладала фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, клетки с фенотипами CD45RA⁻CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁻ соответствовали Th центральной (CM) и эффекторной (EM) памяти соответственно. На всех указанных выше субпопуляциях Th, находившихся

на разных стадиях дифференцировки, при помощи моноклональных антител анализировали уровень экспрессии следующих хемокиновых рецепторов: CCR4 (CD194, клон L291H4), CCR6 (CD196, клон G034E3), CXCR3 (CD183, клон G025H7) и CXCR5 (CD185, клон J252D4). Окраску антителами производили в соответствии с рекомендациями производителей. Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали большим объемом физиологического раствора при 330g в течение 7 мин, после

Таблица 2. Последовательности праймеров и условия проведения ПЦР

Table 2. Sequence of primers and PCR conditions

| Определяемый микроорганизм Microbial species | Последовательности праймеров (5' → 3') Sequence of primers (5' → 3') | t (°C) | Длина фрагмента Length of a fragment (bp) |
|---|---|--------|--|
| <i>Roseburia</i> spp. | F: tactgcattggaactgtcg R: cggcaccgaagagcaat | 57 | 230 |
| <i>Prevotella</i> spp. | F: caccaggcgacgatca R: ggataacgcccggacct | 58 | 283 |
| <i>Akkermansia muciniphila</i> | F: cagcacctgaaggtggggac R: ccttgccgttgcttcagat | 52 | 308 |
| <i>Ruminococcus</i> spp. | F: cctctgaccgctcttaatcgagcttcttc R: ccagttatcggtcccaccttcggcagct | 60 | 482 |
| <i>Sutterella wadsworthensis</i> | F: gtgccagcmgcccgggtaa R: gacgtgtgaggccctagcc | 57 | 715 |

Примечание. F — прямой праймер, R — обратный праймер; последовательность всех праймеров указана с 5'-конца; bp — пары оснований.
Note. F — forward primer, R — reverse primer; the sequence of all the primers is indicated from the 5' end; bp — base pair.

чего надосадов удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2–7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Подготовленные пробы анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ. Сравнительный анализ проводили с помощью дисперсионного анализа с апостериорным тестом HSD для неравных N в программе Statistica-8. Для установления статистических взаимосвязей исследуемых параметров использовали корреляции Спирмена. Достоверными при всех статистических анализах считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Определение состава микробиоты кишечника

Бактериологическим методом у всех пациентов в составе кишечной микробиоты определялись симбиотические микроорганизмы — *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. и *Enterococcus* spp., однако их уровень сильно варьировал. Для каждого вида бактерий мы выделили низкий, средний и высокий уровень соответственно, для *Lactobacillus* spp. он составил 6,0 lg/CFU/g, 7,0–8,0 lg/CFU/g, 9,0 lg/CFU/g, для *Bifidobacterium* spp. — 6,0 lg/CFU/g, 8,0–9,0 lg/CFU/g, 10,0 lg/CFU/g и для *Enterococcus* spp. 3,0–5,0 lg/CFU/g, 6,0–7,0 lg/CFU/g, 8,0 lg/CFU/g. Корреляционный анализ показал наличие положительной корреляционной связи между содержанием *Bifidobacterium* spp. с *Lactobacillus* spp. ($r = 0,59$; $p < 0,05$) и *Enterococcus* spp. ($r = 0,4$; $p < 0,05$).

Хотя у 38% пациентов с РС отмечался средний (7,0–8,0 lg/CFU/g) уровень *Escherichia coli* с нормальной ферментативной активностью (N *E. coli*), были пациенты, у которых эти бактерии не выявлялись (30,4%) или определялись на низком (2,0–6,0 lg/КОЕ/г) уровне (32,1%).

Методом ПЦР-РВ у всех пациентов определялись некультивируемые анаэробные виды бактерий *Bacteroides fragilis* и *Faecalibacterium prausnitzii*. Причем у большинства пациентов (73%) их уровень был средним — 9,0–12,0 lg/КОЕ/г и 9,0–10,0 lg/КОЕ/г соответственно. Однако у 1,8% пациентов наблюдался низкий (6,0–7,0 lg/КОЕ/г), и у 25,0% пациентов — высокий (13,0 lg/КОЕ/г) уровень *B. fragilis*. Сниженный ($< 8,0$ lg/КОЕ/г) уровень *F. prausnitzii* отмечался у 5,4% пациентов, а высокий (11,0 lg/КОЕ/г) — у 21,0% пациентов. Кроме того, у 64,0% пациентов выявлялся другой вид бактерий — *Bacteroides thetaiotaomicron* и у 48,0% *Prevotella* spp., также принадлежащие к филу-

му *Bacteroidetes*. *Roseburia* spp. и *Ruminococcus* spp., принадлежащие к филуму *Firmicutes*, были обнаружены у 56,0 и у 34,0% пациентов соответственно, а *Akkermansia muciniphila* (филум *Verrucomicrobia*) — у 43,0%.

Доля пациентов, с разным уровнем симбиотических микроорганизмов представлена на рисунке 1А.

В составе микробиоты кишечника у пациентов определялись также оппортунистические и патогенные виды микроорганизмов, среди которых чаще высевались гамма-протеобактерии: атипичные формы *E. coli* (A *E. coli*) (83,0%), *Enterobacter* spp./*Citrobacter* spp. (76,4%), а также грибы рода *Candida* (30,4%). При этом уровень атипичных форм *E. coli* отрицательно коррелировал с уровнем *E. coli* с нормальной ферментативной активностью ($r = -0,80$; $p < 0,05$) и имел прямую корреляцию с содержанием *Enterobacter* spp./*Citrobacter* spp. ($r = 0,38$; $p < 0,05$).

Бактериологическим методом у пациентов также выявлялись *Staphylococcus aureus* (14,3%), *Klebsiella* spp. (14,3%), *Proteus* spp. (13,4%), *Clostridium* spp. (11,0%), а при помощи ПЦР-РВ — *Sutterella wadsworthensis* (24,6%), *Parvimonas micra* (16,1%) и *Fusobacterium nucleatum* (5,8%) (рис. 1Б). Отмечалась корреляционная связь при выделении *Clostridium* spp. и *Proteus* spp. ($r = 0,49$; $p < 0,05$).

В целом результаты исследования состава микробиоты пациентов с РС в данном исследовании подтверждают наличие дисбиоза кишечника и его гетерогенность, описанные нами ранее на небольшой выборке пациентов [1]. При этом увеличение выборки обследованных пациентов позволило выявить особенности изменения состава микробиоты кишечника у пациентов с РС при различной длительности, тяжести и скорости прогрессирования заболевания.

Так, у пациентов с длительностью заболевания более 16 лет уровень *Enterococcus* spp. был выше, чем у пациентов с меньшей длительностью РС ($F(3;105) = 3,3024$; $p = 0,0232$). В этот период у пациентов также отмечалось возрастание уровня *Bifidobacterium* spp. до 9,2 lg/CFU/g ($F(3;105) = 2,7551$; $p = 0,0463$). При длительности заболевания более 11 лет возрастала вероятность обнаружения у пациентов *Enterobacter* spp. и грибов рода *Candida* ($F(3;105) = 2,7637$; $p = 0,0499$) (рис. 2).

Напротив, *Parvimonas micra* и *Citrobacter* spp. чаще обнаруживались при длительности заболевания до 10 лет, чем при большей длительности ($F(3;105) = 4,743$; $p = 0,0043$ и $F(3; 105) = 3,6881$; $p = 0,0143$ соответственно (рис. 2).

С помощью корреляционного анализа подтвердились выявленные закономерности: прямая связь с длительностью заболевания *Enterococcus* spp. ($r = 0,29$; $p < 0,05$), *Bifidobacterium* spp. ($r = 0,23$; $p < 0,05$), *Candida* spp. ($r = 0,22$; $p <$

0,05) и обратная зависимость — с *Parvimonas micra* ($r = -0,30$; $p < 0,05$) и *Citrobacter* spp. ($r = -0,24$; $p < 0,05$).

У пациентов с большей тяжестью заболевания (3,5 и более балла по шкале EDSS) наблюдался более высокий уровень *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. и *Clostridium* spp., тогда как пациенты с тяжестью заболевания до 3 баллов имели более высокий уровень *Prevotella* spp. и *Parvimonas micra* (рис. 3). Корреляционный анализ подтвердил наличие взаимосвязи между этими микроорганизмами и EDSS, причем наиболее сильная связь выявлена с *Bifidobacterium* spp. ($r = 0,43$; $p < 0,05$) и *Enterococcus* spp. ($r = 0,40$; $p < 0,05$). Менее сильная связь с коэффициентами корреляции $r = 0,25$, $r = -0,26$ и $r = -0,24$ наблюдалась для *Clostridium* spp., *Prevotella* spp. и *Parvimonas micra* соответственно ($p < 0,05$).

При высокой скорости прогрессирования заболевания (более 0,5) у пациентов отмечался более низкий уровень *Lactobacillus* spp. и *Roseburia* spp., чем у пациентов с низкой скоростью прогрессирования — 6,8 lg/CFU/g против 7,3 lg/CFU/g ($p = 0,039$) и 2,0 lg/CFU/g против 4,0 lg/

CFU/g ($p = 0,023$) соответственно (рис. 4). Хотя при этом корреляция скорости прогрессирования выявлена только с *Roseburia* spp. ($r = -0,28$; $p < 0,05$).

Таким образом, сравнительный и корреляционный анализ показали наличие связи между уровнями симбиотических микроорганизмов и появлением в составе микробиоты ряда патогенных микроорганизмов с тяжестью, длительностью и прогрессированием РС.

Оценка фенотипов популяций клеток Т-хелперов

Анализ фенотипов иммунных клеток проводили, определяя комбинацию хемокиновых рецепторов у пациентов с РС и в группе здоровых доноров.

Сравнение с контрольной группой показало, что изменения у пациентов с РС связаны с перераспределением субпопуляций Т-хелперов 1 и 17 типа: уменьшением содержания Th1 клеток и увеличением представительства клеток Th17/Th22 и DP Th17 в рамках центральной и эффекторной памяти (рис. 5).

Анализ содержания этих субпопуляций у пациентов с разной длительностью РС вы-

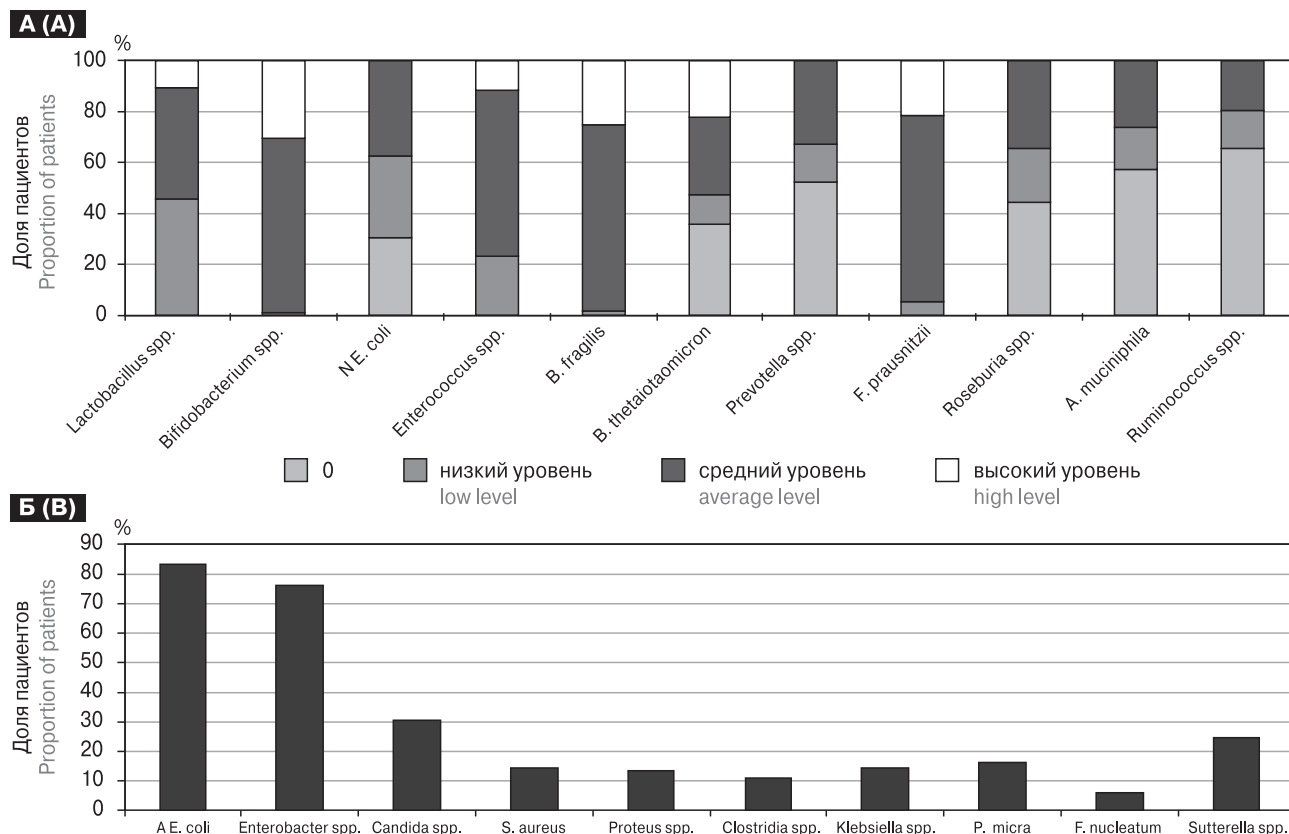


Рисунок 1. Выявляемые микроорганизмы в составе микробиоты кишечника пациентов с РС бактериологическим методом и методом ПЦР в режиме реального времени

Figure 1. Intestinal microbiota composition in MS patients examined by bacteriological method and real-time PCR

Примечание. А — симбиотические виды; Б — оппортунистические виды.

Note. A — symbiotic species; B — opportunistic species.

явил, что субпопуляции Th17/Th22 и DP Th17-клеток в рамках СМ и ЕМ в целом имеют сходную динамику увеличения содержания, с пиком во временном интервале 11–15 лет (рис. 6). Однако корреляционная связь с длительностью заболевания была обнаружена только для DP Th17-клеток СМ ($r = 0,28$; $p < 0,05$) и ЕМ ($r = 0,23$; $p < 0,05$). С другой стороны, содержание Th1 СМ

и ЕМ клеток достоверно не различалось у пациентов с разной длительностью заболевания, но отмечалась отрицательная корреляция ($r = -0,29$; $p < 0,05$).

Доля субпопуляции DP Th17-клеток была также больше у пациентов, имевших более высокий балл по шкале EDSS, как и субпопуляции Th1/Th17 (TEMRA). Напротив, Th2 ЕМ,

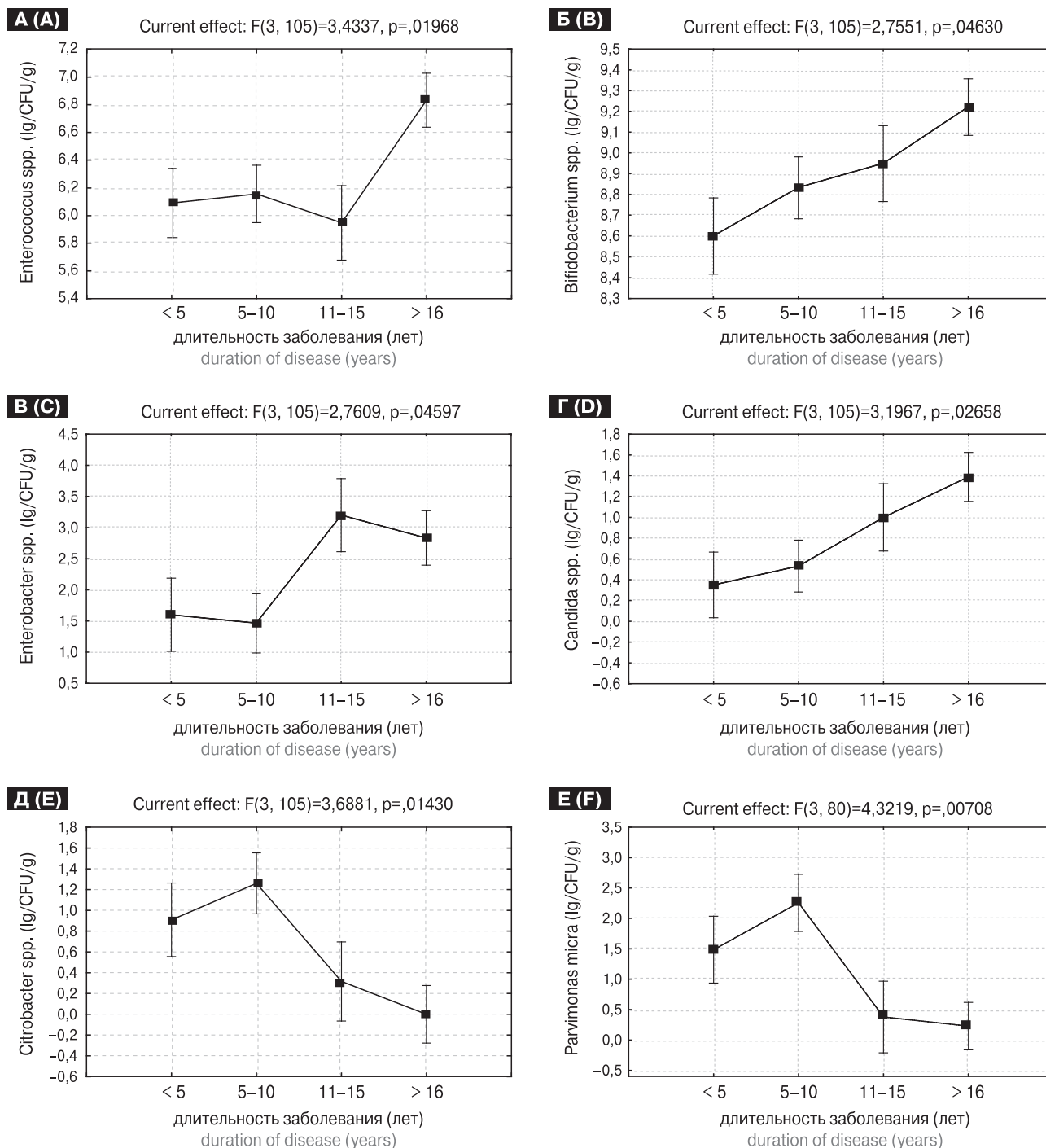


Рисунок 2. Изменения уровней микроорганизмов в составе микробиоты кишечника у пациентов с разной длительностью РС

Figure 2. Changes in percentage of intestinal microbiota species in patients with varying MS duration

Примечание. По оси Y: титр выявляемых микроорганизмов в lg/CFU/g; по оси X: длительность заболевания РС в годах.
Note. Y axis: titer of detectable microorganisms in lg/CFU/g; X axis: duration of MS in years.

Th17 CM и Th17 EM клетки были выявлены в большем количестве у пациентов с низкими баллами по шкале EDSS (рис. 8), при этом содержание Th17 CM клеток у них было сопоставимо с контрольными лицами. Интересно, что низкая представленность Th2 EM и Th17 EM клеток была характерна не только для контрольных лиц, но и для пациентов с тяжелым течением РС (рис. 7). Корреляционный анализ подтвердил наличие связи с EDSS субпопуля-

ции DP Th17 CM ($r = 0,34$; $p < 0,05$) и Th1/Th17 (TEMRA) ($r = 0,31$; $p < 0,05$).

Наконец, пациенты с низкой скоростью прогрессирования заболевания имели более высокое содержание Th1 EM клеток, чем пациенты с быстрым прогрессированием РС, однако этот уровень был ниже, чем у контрольных лиц (рис. 8). Кроме того, у пациентов с высокой скоростью прогрессирования заболевания уровень Th1/Th17 EM клеток был повышен как по срав-

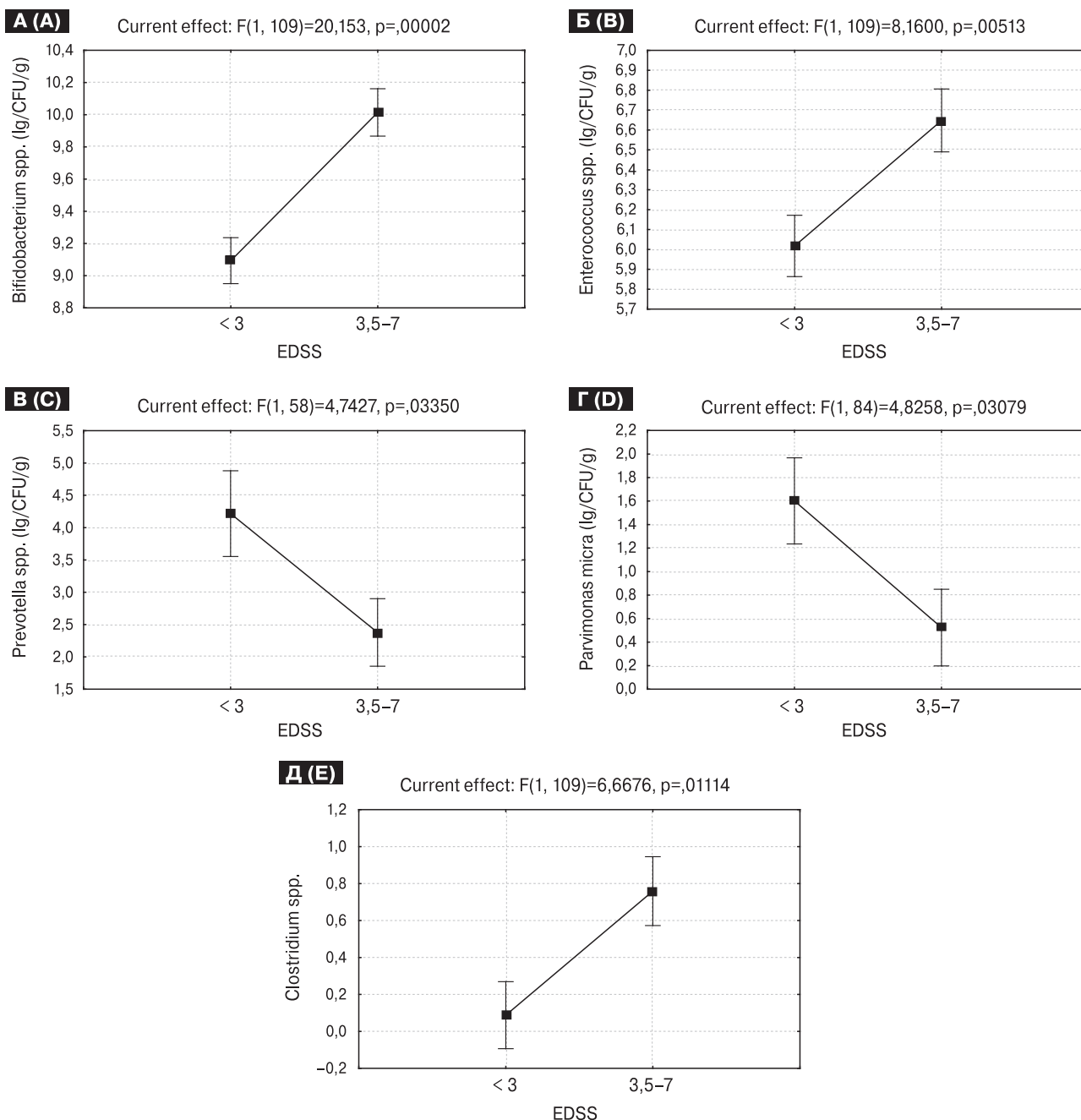


Рисунок 3. Различия уровней микроорганизмов в составе микробиоты кишечника у пациентов с разной тяжестью РС

Figure 3. Changes in percentage of intestinal microbiota species in patients with varying MS severity

Примечание. По оси Y: титр выявляемых микроорганизмов в lg/CFU/g; по оси X: баллы по шкале EDSS.

Note. Y axis: titer of detectable microorganisms in lg/CFU/g; X-axis: EDSS scale, score.

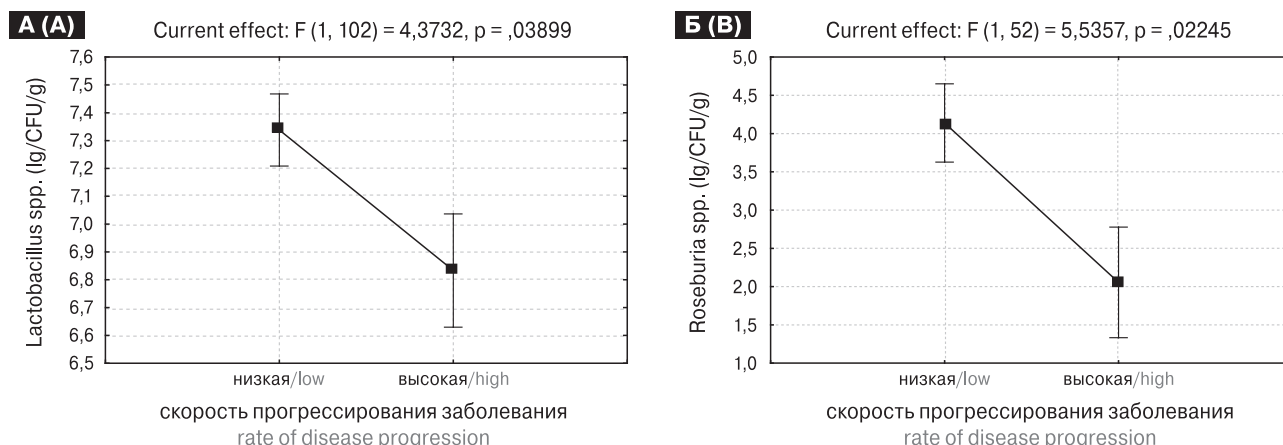


Рисунок 4. Различия в уровнях *Lactobacillus* spp. и *Roseburia* spp. у пациентов с низкой и высокой скоростью прогрессирования РС

Figure 4. Differences in percentage of *Lactobacillus* spp. and *Roseburia* spp. in patients with a low and high rate of MS progression

Примечание. По оси Y: титр выявляемых микроорганизмов в Ig/CFU/g; по оси X: скорость прогрессирования РС.
Note. Y axis: titer of detectable microorganisms in Ig/CFU/g; X axis: rate of MS progression.

нению с контрольными лицами, так и с пациентами, имевшими низкую скорость прогрессирования РС. Коэффициенты корреляции между скоростью прогрессирования и этими субпопуляциями клеток составили $r = -0,33$ и $r = 0,26$, соответственно для Th1 EM и Th1/Th17 EM клеток ($p < 0,05$). Таким образом, наблюдалась связь клинических показателей с содержанием определенных субпопуляций Т-хелперов.

Оценка связи содержания микроорганизмов в составе микробиоты кишечника с циркулирующими субпопуляциями иммунных клеток у пациентов с РС

Для проверки связи между уровнем выявленных микроорганизмов и содержанием субпопуляций иммунных клеток был проведен корреляционный анализ. Данный анализ проводили на когорте пациентов с РС в количестве 69 человек (46 женщин и 23 мужчины), у которых одно-

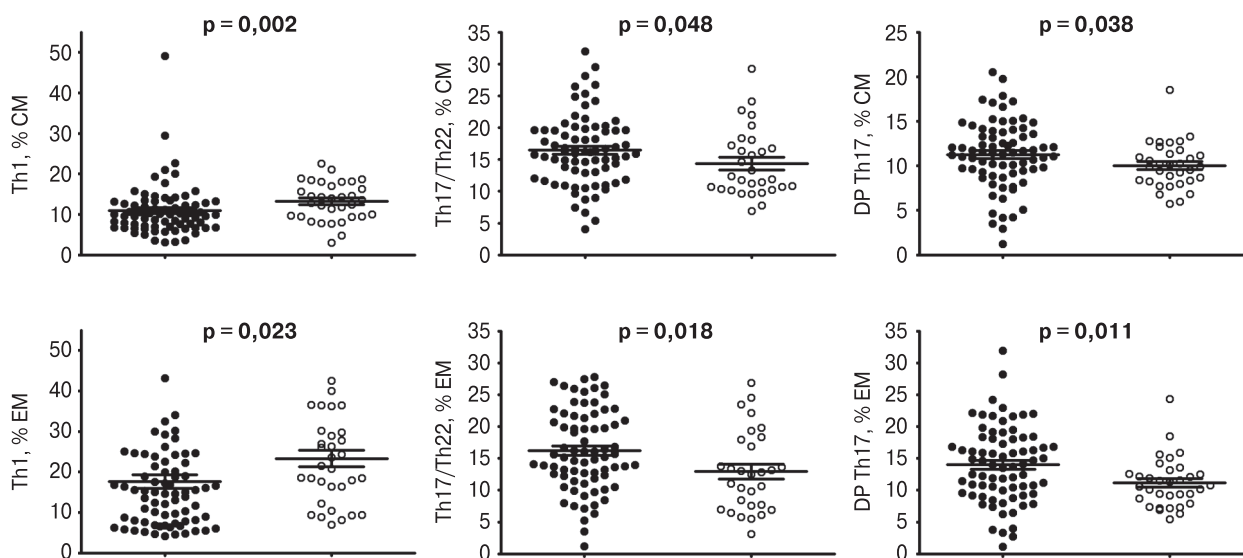


Рисунок 5. Различия в содержании субпопуляций Т-хелперов в крови пациентов с РС и здоровых доноров

Figure 5. Differences in peripheral blood T helper subset composition in MS patients and healthy donors

Примечание. Черные кружки — пациенты с РС; белые кружки — здоровые лица.
Note. Black circles — patients with MS; white circles — healthy controls.

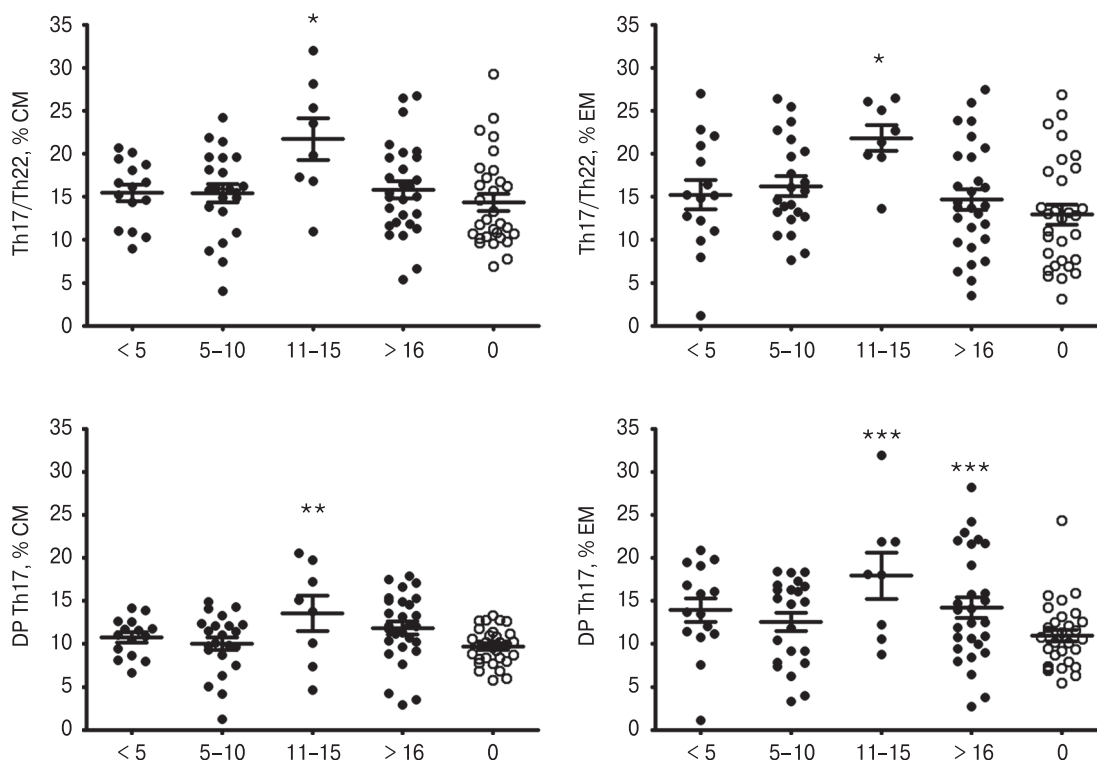


Рисунок 6. Сравнение содержания субпопуляций Th17/Th22 и DP Th17 в рамках CM и EM у пациентов с разной длительностью РС

Figure 6. Percentage of central and effector memory Th17/Th22 and DP Th17 subsets in patients with varying MS duration

Примечание. Черные кружки — пациенты с РС; белые кружки — здоровые лица; по оси Y: исследуемые субпопуляции Th; по оси X: длительность заболевания в годах; 0 — здоровые лица; * — достоверные отличия от других групп; ** — отличия от группы здоровых лиц, группы < 5 лет и группы 5–10 лет; *** — отличия от группы здоровых лиц.

Note. Black circles — MS patients; white circles — healthy controls; Y axis: Th cell subsets; X axis: MS duration in years; 0 — healthy controls; * — significant difference from other groups; ** — compared with healthy controls, a group of 5 years and a group of 5–10 years; *** — compared with healthy controls.

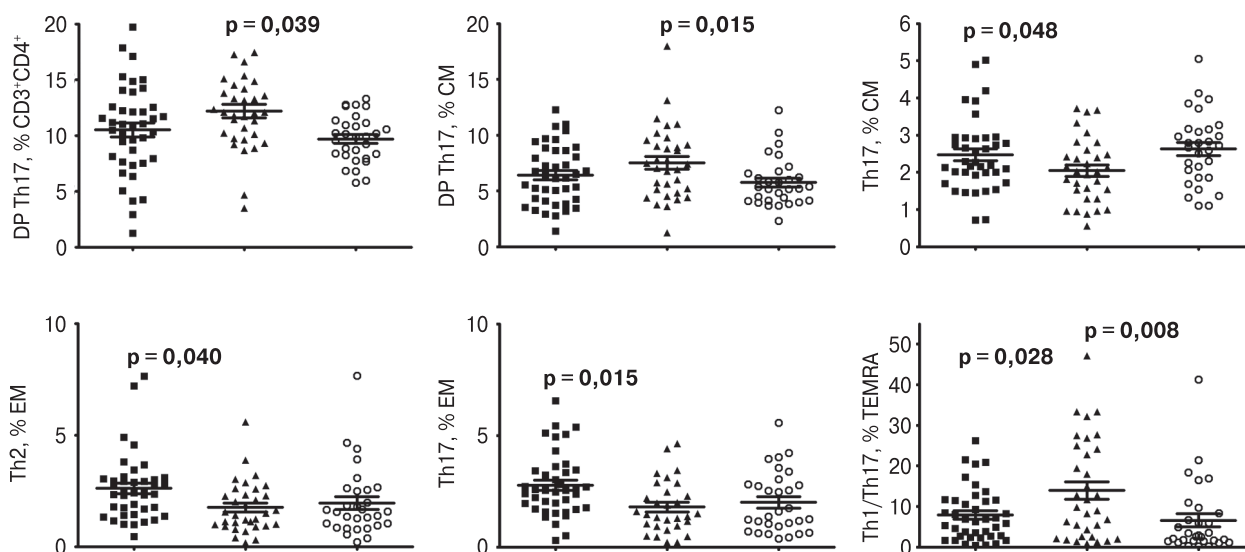


Рисунок 7. Сравнение содержания субпопуляций Т-хелперов у пациентов с различной тяжестью РС

Figure 7. Differences in peripheral blood T helper subset composition in MS patients with varying severity

Примечание. Черные квадраты — EDSS < 3; черные треугольники — EDSS = 3,5–7; белые кружки — здоровые лица.

Note. Black squares — EDSS < 3; black triangles — EDSS = 3,5–7; white circles — healthy faces.

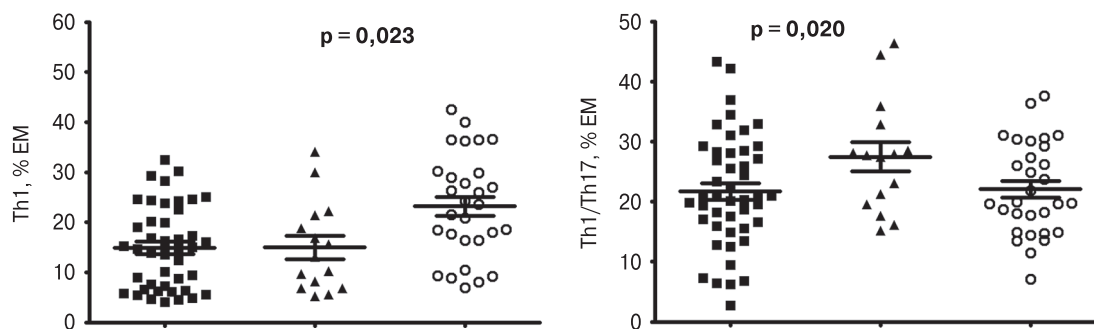


Рисунок 8. Сравнение содержания субпопуляций Т-хелперов у пациентов с высокой и низкой скоростью прогрессирования РС

Figure 8. Differences in peripheral blood T helper subset composition in fast and slow MS progressors

Примечание. Черные квадраты — низкая скорость прогрессирования РС; черные треугольники — высокая скорость прогрессирования РС; белые кружки — здоровые лица.

Note. Black squares — slow PC progression; black triangles — fast PC progression; white circles — healthy controls.

временно исследован состав микробиоты и фенотипы иммунных клеток. Результаты выявленных корреляций представлены в таблице 3.

Из таблицы видно, что уровень Th1 клеток на разных стадиях дифференцировки непосредственно связан с уровнем *Lactobacillus* spp. ($r = 0,32$; $p < 0,05$) и *A. muciniphila*. ($r = 0,36$; $p < 0,05$), поэтому снижение уровня этих микроорганизмов будет приводить к уменьшению содержания Th1 клеток. Напротив, с *Enterococcus* spp., *Prevotella* spp., *Enterobacter* spp. выявлена обратная зависимость, и увеличение титров этих бактерий также будет приводить к уменьшению субпопуляции Th1 клеток. В конечном счете, вероятно, уровень Th1 клеток будет определяться соотношением всех этих микроорганизмов.

Prevotella spp. и *Enterobacter* spp. были также связаны с численностью субпопуляции Th17 с $r = 0,32$ и $r = 0,27$ ($p < 0,05$) соответственно. Других зависимостей уровня микроорганизмов с содержанием этой субпопуляции не выявлено.

Интересно, что содержание общей субпопуляции Th1/Th17 в зависимости от степени дифференцировки в большей степени коррелировало с уровнем *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и отрицательно коррелировало с уровнем атипичных *E. coli* и *Enterococcus* spp. (табл. 3).

Уровень *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. и *Enterobacter* spp. коррелировал также с содержанием субпопуляций Th17/Th22 и DP Th17, однако эти зависимости были противоположными тем, что отмечались для Th1. Кроме того, с уровнем Th17/Th22 были связаны *Sutterella* spp. ($r = -0,32$; $p < 0,05$), *Prevotella* spp. ($r = 0,32$; $p < 0,05$), *Klebsiella* spp. ($r = -0,28$; $p < 0,05$). Выявлена также корреляционная связь *Bifidobacterium* spp. с общим содержанием DP Th17 ($r = 0,29$; $p < 0,05$).

Таким образом, наибольшая связь с циркулирующими иммунными клетками выявлена для трех микроорганизмов *Lactobacillus*

spp., *Enterococcus* spp. и *Enterobacter* spp., причем действие *Enterococcus* spp. на субпопуляции Th-клеток было синергично с действием *Enterobacter* spp. и антагонистично с *Lactobacillus* spp.

Обсуждение

В настоящее время можно считать установленными фактами патогенную роль Th17-клеток и влияние микробиоты кишечника на их дифференцировку, а также изменение кишечного микробиоценоза (дисбиоз) при РС. Однако связаны ли между собой изменения микробного профиля в кишечнике с циркулирующими в крови различными субпопуляциями Т-клеток, в том числе Th17 — открытый вопрос, ответ на который важен, как с точки зрения анализа причин возникновения данного заболевания и механизмов его развития, так и для его терапии.

В данной работе предпринята попытка выявить взаимосвязь уровней отдельных видов или родов микроорганизмов в составе микробиоты кишечника с уровнем субпопуляций циркулирующих в крови Th-клеток. Сложность этой задачи определяется как ограниченностью выборки определяемых видов микроорганизмов и индивидуальной изменчивостью состава микробиоценоза кишечника, так и вариабельностью тяжести, скорости прогрессирования, длительности РС и других факторов. Кроме того, в настоящее время неизвестна роль отдельных видов микроорганизмов при РС, что не позволяет делать однозначных выводов. Тем не менее, нам удалось выявить ряд закономерностей, которые имеют, в том числе, и практическое значение.

При анализе полученных результатов принималось во внимание, что кишечная микробиота играет важнейшую роль в формировании и реализации функций головного мозга

и нервной системы за счет многочисленных микробных соединений, нейрометаболитов, кофакторов и сигнальных молекул, влияющих на метаболические, иммунные, гормональные и нервные реакции в желудочно-кишечном тракте и вне его и наличия изменений эпигенетического характера на уровне бактерий и клеток организма [9].

Полученные нами данные о высокой индивидуальной изменчивости состава микробиоты кишечника у пациентов с РС согласуются с данными других авторов, показавших это методами секвенирования микробиома [24, 41, 58]. В работе Miyake S. и соавт. (2015) показано наличие дисбиоза кишечника при РС, который характеризовался изменением относительной численности 21 вида микроорганизмов в составе микробиоты пациентов от здоровых лиц. Известно, что дисбиоз кишечника способствует индукции воспаления в организме человека вследствие эндотоксинемии из-за резко увеличенного поступления в кровь эндотоксинов и мурамилдипептидов грамотрицательных и грамположительных бактерий [61].

Увеличение в составе микробиоценоза кишечника пациентов с РС видов бактерий, принадлежащих роду *Bifidobacterium*, уже было показано ранее [58]. В данном исследовании отмечено, что увеличение количества *Bifidobacterium* spp. происходит у пациентов с большей тяжестью и длительностью заболевания. Интересно, что ранее на модели ЭАЭ более высокий уровень *Bifidobacterium* spp. отмечался на поздних стадиях у крыс, все еще имевших клинические симптомы, по сравнению с выздоровевшими крысами [2]. Выявленная корреляционная связь уровня *Bifidobacterium* spp. с общим содержанием DP Th17-клеток, которые обладают высокой «пластичностью» и способны менять свой фенотип и функциональную активность в зависимости от микроокружения в тканях [75], может свидетельствовать о негативной роли высокого уровня *Bifidobacterium* spp. при РС.

Несколько иная ситуация может быть с *Enterococcus* spp., обладающими более выраженным иммуномодулирующим действием, и с уровнем которых показана связь численного содержания при РС как DP Th17, Th17/Th22, Th1/Th17, так и Th1. Ранее на модели ЭАЭ были показаны существенные различия динамики изменений уровня Т- и В-клеток при введении высоких доз пробиотических энтерококков (8,0 lg/CFU/g) и иммуномодулятора — глатирамера ацетата (ГА). Это приводило к тому, что при совместном использовании ГА с пробиотическими энтерококками иммуномодулирующая активность последних, по-видимому, подавляла иммуномодулирующие эффекты и нейропротективное действие

Таблица 3. Выявленные корреляции между уровнем микроорганизмов и субпопуляциями Th-клеток (коэффициенты корреляции, r)
Table 3. A relation between percentage of microbial species and peripheral blood Th cell subsets (correlation coefficient, r)

| Микроорганизм Microbial species | Субпопуляции Th/Th subsets | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|----------------------------|-------|-------|------------|----|-------|------------|-------|----|------------|----|----|------------|-------|-------|
| | Th1 | | | Th17 | | | Th17/Th22 | | | DP Th17 | | | Th2 | | |
| | Все All | CM | EM | Все all | CM | EM | Все All | CM | EM | Все All | CM | EM | Все All | CM | EM |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | | 0,32 | 0,26 | | | | -0,25 | -0,39 | | | | | -0,25 | -0,44 | -0,28 |
| <i>Bifidobacterium</i> spp. | | | | | | | 0,28 | | | | | | 0,29 | | |
| <i>Enterococcus</i> spp. | | -0,24 | | | | -0,24 | | | | | | | 0,26 | 0,44 | |
| <i>N.E. coli</i> | | | -0,33 | | | 0,28 | | | | | | | | | -0,33 |
| <i>Prevotella</i> spp. | | -0,33 | | | | | | 0,32 | | | | | | | |
| <i>Akkermansia muciniphila</i> | 0,36 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>A.E. coli</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Enterobacter</i> spp. | -0,26 | -0,38 | -0,35 | | | -0,29 | | | | | | | 0,26 | | 0,31 |
| <i>Klebsiella</i> spp. | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Sutterella wadsworthensis</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Clostridium</i> spp. | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | -0,28 |

препарата в целом [3]. Подобный феномен, вероятно, наблюдается и при высоком уровне эндогенных энтерококков у пациентов с РС, которые могут снижать эффективность проводимой терапии. Выявление этих бактерий в высоком титре именно у пациентов с более тяжелым течением заболевания подтверждает эту точку зрения. Поскольку введение только пробиотических энтерококков в высокой дозе, оказывало благоприятное действие на течение ЭАЭ у животных, сопоставимое с действием ГА [3, 10], возможно при высоком уровне эндогенных энтерококков применение иммуномодуляторов не требуется.

Вероятность увеличения патогенных популяций Th17 — DP Th17 и Th17/Th22 — возрастает также при низком уровне *Lactobacillus* spp. Использование пробиотических лактобацилл оказывало позитивный эффект на течение ЭАЭ у животных [76], что также подтверждает необходимость присутствия в кишечнике большого количества бактерий, принадлежащих к роду *Lactobacillus*. Уменьшение содержания *Lactobacillus* spp. отмечали в своем исследовании Chen и соавт. (2016) [24]. Более того, было показано, что уровень CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺ Th в периферической крови больных РС достоверно превышал значения, полученные для условно здоровых доноров, а увеличение этих клеток в циркуляции коррелировало с результатами балльной расширенной шкалы инвалидизации (EDSS) [7].

Интересно, что при наличии в составе микробиоты *Enterobacter* spp. у пациентов отмечались однонаправленные изменения содержания субпопуляций иммунных клеток с энтерококками, а не с другими энтеробактериями — *E. coli*. Ранее нами показано, что заселение *Enterobacter* spp. в кишечнике происходит на фоне уменьшения симбиотических *E. coli* при лечении пациентов с РС пероральными препаратами, особенно финголимодом [4]. Однако высокая частота встречаемости *Enterobacter* spp. у пациентов наряду с отсутствием связи этих бактерий с тяжестью и прогрессированием заболевания, позволяет предположить, что эти кишечные бактерии связаны преимущественно с расстройствами функций ЖКТ, которые встречаются у 70–90% пациентов [1, 47]. Родственные *Enterobacter* spp. бактерии — *Citrobacter* spp. выявлялись реже и в основном у пациентов с длительностью РС до 10 лет.

В исследовании Sekanaviciute E. с соавт. (2017) [23] одним из преимущественных родов в составе микробиоты пациентов с РС был *Acinetobacter*. Мы не определяли эти бактерии методом ПЦР, а при бактериологическом исследовании *Acinetobacter baumannii* были выделены лишь у одного пациента, причем в сочетании

с *E. cloacae* и *C. perfringens*. Интересно, что у пациента отмечался вторично-прогрессирующий РС, 6,5 баллов по шкале EDSS и длительность заболевания — 19 лет. Наличие *C. perfringens* у этого пациента с тяжелым течением РС отражает общую закономерность, наблюдаемую в данной выборке.

Несмотря на то что *Clostridium* spp. выявлялись редко, наблюдалась связь их появления с тяжестью заболевания. Частота выявления *Clostridium* spp. — 11% пациентов, сопоставима с ранее описанной другими авторами, которые обнаружили серопозитивность к *Clostridium* также у 11% пациентов [67]. Известно, что эпсилон-токсин *C. perfringens* способен повреждать нейроны мозжечка и вызывать гибель олигодендроцитов и демиелинизацию [49]. Следует отметить, что в нашей когорте пациентов с РС преимущественно выявлялись именно *C. perfringens*, хотя иногда встречались и *C. difficile*.

В данном исследовании показано наличие отрицательной корреляционной связи между присутствием в составе микробиоты *Clostridium* spp. и увеличением популяции Th2-клеток, однако при оптиконеуромиелите T-клетки пациентов, реагирующие на антигены *C. perfringens*, относились к Th17-клеткам [74].

Нами не обнаружено какой-либо связи уровней *Bacteroides* spp. с тяжестью, скоростью прогрессирования или длительностью РС, как и с исследованными популяциями иммунных клеток. Ранее у пациентов с РС обнаружено снижение некоторых видов *Bacteroides* — *B. stercoris*, *B. coprocola*, и *B. coprophilus* [58]. В данном исследовании оценивался уровень других представителей этого рода — *B. fragilis* и *B. thetaiotaomicron*. Известно, что полисахарид А *B. fragilis* оказывает протективное действие в модели ЭАЭ за счет стимуляции регуляторных T-клеток [62]. Поскольку у пациентов уровень *B. fragilis* различался, можно предположить, что количество регуляторных T-клеток также будет отличаться.

Интересно, что у родственных бактериоидов *Prevotella* spp. наблюдалась связь с тяжестью заболевания и уровнем иммунных клеток. У пациентов с меньшей тяжестью РС был обнаружен более высокий уровень *Prevotella* spp., что согласуется с данными Miyake S. и соавт. (2015) [58], выявившими отрицательную корреляцию *Prevotella copri* с патогенезом РС. Для *Prevotella* spp., как и для *Bacteroides* spp. показана способность стимулировать дифференцировку регуляторных T-клеток [54], тем не менее в нашем исследовании уровень *Prevotella* spp. прямо коррелировал с уровнем Th17/Th22 клеток и обратно коррелировал с уровнем Th1. Интересно, что при ревматоидном артрите показано увеличение численности *Prevotella copri* у заболевших [70].

Показано, что при РС происходит уменьшение бутират-продуцирующих бактерий [58], которые также стимулируют дифференцировку регуляторных Т-клеток [71]. В данном исследовании определялись бутират-продуцирующие *F. prausnitzii* и *Roseburia* spp., но не оценивался уровень регуляторных Т-клеток. Уровень *F. prausnitzii* у большинства пациентов находился в пределах референсных значений, лишь у 5% отмечалось их уменьшение. Для *Roseburia* spp. были выявлены более существенные колебания уровней вплоть до отсутствия у 44%, причем была выявлена отрицательная корреляционная связь между уровнем этих бактерий и скоростью прогрессирования заболевания.

В исследовании Jangi S. и соавт. (2015) у пациентов с РС выявлено увеличение количественного содержания рода *Akkermansia*, принадлежащего к филуму *Verrucomicrobia*. В данном исследовании определялись *A. muciniphila*. Известно, что эти бактерии являются муцинередуцирующими [28], следовательно, уменьшая слой слизи, могут способствовать нарушению целостности кишечного барьера, транслокации бактерий в несвойственные для их обитания ниши и взаимодействию резидентных иммунных клеток с микробными антигенами [28, 36]. Проникновение микроорганизмов в пространство под базальной мембраной эпителиальных пластов является одним из важнейших факторов, отвечающих за поляризацию «наивных» Th в сторону Th17 [15]. С другой стороны, *A. muciniphila* способны метаболизировать муцин до короткоцепочечных жирных кислот, которые обладают иммунорегуляторными свойствами [29].

Несмотря на то что в целом содержание *Akkermansia* spp. увеличено у пациентов с РС, по сравнению со здоровыми лицами, у пациентов, получавших иммуномодулирующую терапию, их количество уменьшалось [41], что согласуется с данными нашего исследования, так как *A. muciniphila* были обнаружены лишь у 42% пациентов. Наличие и уровень *A. muciniphila* у пациентов с РС коррелировали с содержанием Th1-клеток. Sekanaviciute E. и соавт. (2017) [23] получили сходный эффект *in vitro*, когда к мононуклеарным клеткам крови доноров добавляли экстракты из образцов стула, содержавших *A. muciniphila*, количество Th1, продуцирующих IFN γ , было больше, чем при добавлении экстрактов, не содержащих *A. muciniphila*.

Учитывая тот факт, что количество *Akkermansia* spp. было выше у пациентов с РС, чем у здоровых лиц [41], эти бактерии при РС оказывают скорее негативное влияние, тем более, что показана способность *A. muciniphila* усиливать воспаление во время кишечной инфекции [36]. Поскольку практически у всех пациентов в со-

ставе микробиоты выявлены микроорганизмы, которые могут вызывать кишечные инфекции, это также предполагает их патогенную роль. Тем не менее в эксперименте самцы, имевшие *A. muciniphila*, были резистентны к индукции ЭАЭ в отличие от восприимчивых самок, не имевших этих микроорганизмов [57].

В составе микробиоты исследуемой когорты пациентов редко определялись *S. aureus*, хотя это один из самых распространенных патогенов в человеческой популяции. Возможно, это объясняется тем, что даже в носовых пазухах, являющихся основной нишей обитания этих микроорганизмов, они встречаются менее чем у трети пациентов с РС [60]. Эти авторы обнаружили у пациентов с РС *S. aureus*, имеющие энтеротоксин А, особенно в стадии обострения, и предположили значимость их наличия для обострения РС. Мы не выявили связи наличия этих бактерий с фенотипами исследованных популяций Th-клеток. Возможно, это обусловлено тем, что *S. aureus* в большей степени влияет на клетки врожденного иммунитета, как описывается в обзоре Askarian F. и соавт. (2018) [13].

Повышение уровня *Candida* spp. в составе микробиоты кишечника пациентов по мере увеличения длительности РС, может быть результатом развивающегося дисбиоза в кишечнике. Хотя не было выявлено связи этих микроорганизмов с тяжестью и прогрессированием заболевания, нельзя исключить этого события, поскольку на модели ЭАЭ показано, что *Candida albicans* способствуют более тяжелому течению заболевания у животных [33], а у пациентов с РС показана связь *Candida* с прогрессированием заболевания [69].

Мы не обнаружили достоверных различий в уровне Th17/Th22-клеток в рамках СМ у пациентов с выявленными *Candida* spp., по сравнению с пациентами, не имевшими этих микроорганизмов, тем не менее отмечалась тенденция их более высокого содержания в присутствии *Candida* spp. (17,6% против 15%; $p = 0,11$). Известно, что эти клетки продуцируют IL-22, умеренный уровень которого необходим для защиты кишечного и дыхательного тракта хозяина от грибковых и бактериальных патогенов, однако повышенный уровень этого цитокина, способствует поддержанию воспаления в этих тканях [17].

Ранее при РС была выявлена повышенная частота серопозитивности к нескольким видам грибов рода *Candida* [18] по сравнению со здоровыми лицами, и в спинномозговой жидкости (СМЖ) некоторых пациентов с РС обнаружены белки и ДНК *Candida* spp. [65]. Поскольку мы выявили *Candida* spp. в составе кишечной микробиоты пациентов с РС, можно предпо-

ложить, что в СМЖ они попадают из кишечника вследствие транслокации из-за повышения проницаемости кишечного барьера — феномен, показанный у пациентов с РС Buscarinu M.C. и соавт. (2017) [22].

При анализе фенотипов иммунных клеток были подтверждены ранее полученные данные о том, что у пациентов с РС увеличивается относительное содержание CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺ Т-хелперов, способных к продукции IL-17 и IL-22, в рамках СМ и ЕМ популяций Th [7]. Хотя изначально IL-22 идентифицирован как цитокин, продуцируемый Th1 подмножеством [38] и подмножеством Th22 CD4⁺ Т-клеток человека [30], считается, что этот цитокин — характерный продукт Th17-клеток [48]. Он является ключевым медиатором в координации защиты на барьерных участках, таких как кожа, респираторный и кишечный тракты, из-за способности повышать антибактериальную резистентность эпителиальных клеток [16, 77]. Несмотря на то что количество циркулирующих Th17 ниже, чем Th1, именно эти клетки способны нарушать целостность гематоэнцефалического барьера [42], активно проникают в ЦНС [44] и обнаруживаются в активных очагах РС [50].

Поскольку микробиота кишечника влияет не только на образование Th17, но и запускает процессы, связанные с формированием индукцибельных регуляторных Т-лимфоцитов, способных ограничивать воспалительные реакции как в кишечнике, так и в других отделах организма, включая ЦНС [64], в дальнейшем необходимо проанализировать другие популяции иммунных клеток.

Заключение

В настоящее время исследованию микробиоты кишечника при различных заболеваниях ЦНС уделяется большое внимание, поскольку измененное сообщество микроорганизмов в кишечнике может не только способствовать дисфункции ЖКТ, но и модулировать иммунные функции организма, поддерживая патологический процесс, усугубляя клиническое течение заболевания и влияя на эффективность проводимой терапии.

В данной работе показана значимость не только изменения видового разнообразия кишечной микробиоты, но и количественного содержания отдельных ее представителей для тяжести и прогрессирования заболевания. Обнаружено, что при разном уровне грамположительных и грамотрицательных бактерий, принадлежащих к различным филумам, семействам и видам, отличающимся по антигенным свойствам, рецепторным молекулам и продуцируемым метаболитам в кишечнике, в крови пациентов варьирует количество различных популяций Т-клеток, а также их соотношение и степень дифференцировки. То есть изменение уровня отдельных представителей микроорганизмов, населяющих кишечник, существенно влияет на субпопуляционный состав Th-клеток и спектр секретируемых ими эффекторных молекул.

Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что выявление механизмов прямого и опосредованного влияния микробиоты на иммунную систему будет способствовать разработке принципиально новых стратегий терапии РС и других аутоиммунных заболеваний.

Список литературы/References

1. Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Ермоленко Е.И., Елисеев А.В., Мацулевич А.В., Бисага Г.Н., Скулябин Д.И., Суворов А.Н., Клименко В.М. При рассеянном склерозе изменяется качественный и количественный состав микробиоты кишечника // Медицинский академический журнал. 2015. Т. 15, № 3. С. 55–67. [Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Ermolenko E.I., Eliseev A.V., Matsulevich A.V., Bisaga G.N., Skulyabin D.I., Suvorov A.N., Klimenko V.M. Multiple sclerosis is associated with altered quantitative and qualitative composition of intestinal microbiota. *Meditinskij akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*, 2015, vol. 15, no. 3, pp. 55–67. (In Russ.)]
2. Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Мацулевич А.В., Елисеев А.В., Ермоленко Е.И., Суворов А.Н., Клименко В.М. Изменение качественного и количественного состава кишечной микробиоты у крыс при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2015. Т. 101, № 11. С. 1235–1249. [Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Matsulevich A.V., Eliseev A.V., Ermolenko E.I., Suvorov A.N., Klimenko V.M. Changes in the qualitative and quantitative composition of the intestinal microflora in rats in experimental allergic encephalomyelitis. *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology (formerly I.M. Sechenov Physiological Journal)*, 2015, vol. 101, no. 11, pp. 1235–1249. (In Russ.)]
3. Абдурасулова И.Н., Ермоленко Е.И., Мацулевич А.В., Абдурасулова К.О., Тарасова Е.А., Кудрявцев И.В., Бисага Г.Н., Суворов А.Н., Клименко В.М. Влияние пробиотических энтерококков и глатирамера ацетат на тяжесть экспериментального аллергического энцефаломиелита у крыс // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2016. Т. 102, № 4. С. 463–479. [Abdurasulova I.N., Ermolenko E.I., Matsulevich A.V., Abdurasulova K.O., Tarasova E.A., Kudryavtsev I.V., Bisaga G.N., Suvorov A.N., Klimenko V.M. Effects of probiotic Enterococci and Glatiramer Acetate on the severity of experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology (formerly I.M. Sechenov Physiological Journal)*, 2016, vol. 102, no. 4, pp. 463–479. doi: 10.1007/s11055-017-0484-1 (In Russ.)]
4. Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Никифорова И.Г., Ильвес А.Г., Ивашкова Е.В., Мацулевич А.В., Татаринов А.Е., Шангина Л.В., Ермоленко Е.И., Клименко В.М., Столяров И.Д., Суворов А.Н. Особенности состава микробиоты кишечника у пациентов с рассеянным склерозом, получающих разные ПИТРС // Журнал неврологии и психиатрии

- им. С.С. Корсакова. 2018. Т. 118, № 8, вып. 2. С. 62–69. [Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Nikiforova I.G., Il'ves A.G., Ivashkova E.V., Matsulevich A.V., Tatarinov A.E., Shangina L.V., Ermolenko E.I., Klimenko V.M., Stolyarov I.D., Suvorov A.N. The intestinal microbiota composition in patients with multiple sclerosis receiving different disease-modifying therapies DMT. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2018, vol. 118, no. 8, iss. 2, pp. 62–69. doi: 10.17116/jnevro201811808262 (In Russ.)]
5. Кудрявцев И.В., Борисова А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 3. С. 239–250. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Totolian A.A. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral blood. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 3, pp. 239–250. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250 (In Russ.)]
 6. Кудрявцев И.В., Ильвес А.Г., Борисов А.Г., Минеев К.К., Петров А.М., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Столяров И.Д. ССР6-позитивные Т-хелперы периферической крови при рассеянном склерозе // Цитокины и воспаление. 2016. Т. 15, № 2. С. 166–172. [Kudryavtsev I.V., Ilves A.G., Borisov A.G., Mineev K.K., Petrov A.M., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Stolyarov I.D. CCR6-positive T-helper subsets from peripheral blood in multiple sclerosis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2016, vol. 15, no. 2, pp. 166–172. (In Russ.)]
 7. Кудрявцев И.В., Савицкий В.П. Многоцветный анализ основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 6 (14), № 3 (1). С. 94–97. [Kudryavtsev I.V., Savitsky V.P. Multicolor flow cytometric analysis of the main subpopulations of T-helpers and cytotoxic T-cells from peripheral blood. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2012, vol. 6 (14), no. 3 (1), pp. 94–99. (In Russ.)]
 8. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 3. С. 255–268. [Khaydukov S., Baidun L., Zurochka A., Totolian A. Standardized technology “Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers” (Draft). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 255–268. doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268 (In Russ.)]
 9. Шендеров Б.А., Голубев В.Л., Данилов А.Б., Прищепа А.В. Кишечная микробиота человека и нейродегенеративные заболевания // Поликлиника. 2016. № 1 (спецвыпуск). С. 7–13. [Shenderov B.A., Golubev V.L., Danilov A.B., Prischepe A.V. Gut human microbiota and neurodegenerative diseases. *Poliklinika = Polyklinika*, 2016, no. 1 (special iss.), pp. 7–13. (In Russ.)]
 10. Abdurasulova I.N., Matsulevich A.V., Tarasova E.A., Kudryavtsev I.V., Serebriakova M.K., Ermolenko E.I., Bisaga G.N., Klimenko V.M., Suvorov A.N. Enterococcus faecium L3 and glatiramer acetate ameliorate of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in rats by affecting different populations of immune cells. *Beneficial Microbes*, 2016, vol. 7, no. 5, pp. 719–729. doi: 10.3920/BM2016.0018
 11. Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S. Main features of human T helper 17 cells. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2013, vol. 1284, pp. 66–70. doi: 10.1111/nyas.12075
 12. Aranami T., Yamamura T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol. Int.*, 2008, vol. 57, no. 2, pp. 115–120. doi: 10.2332/allergolint.R-07-159
 13. Askarian F., Wagner T., Johannessen M., Nizet V. Staphylococcus aureus modulation of innate immune responses through Toll-like (TLRs), (NOD)-like (NLRs) and C-type lectin (CLRs) receptors. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2018. doi: 10.1093/femsre/fuy025
 14. Atarashi K., Nishimura J., Shima T., Umesaki Y., Yamamoto M., Onoue M., Yagita H., Ishii N., Evans R., Honda K., Takeda K. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature*, 2008, vol. 455, no. 7214, pp. 808–812. doi: 10.1038/nature07240
 15. 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, no. 6015, pp. 337–341. doi: 10.1126/science.1198469
 16. Aujla S.J., Chan Y.R., Zheng M., Fei M., Askew D.J., Pociask D.A., Reinhart T.A., McAllister F., Edeal J., Gaus K., Husain S., Kreindler J.L., Dubin P.J., Pilewski J.M., Myerburg M.M., Mason C.A., Iwakura Y., Kolls J.K. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.*, 2008, vol. 14, no. 3, pp. 275–281. doi: 10.1038/nm1710
 17. Basu R., O'Quinn D.B., Silberger D.J., Schoeb T.R., Fouser L., Ouyang W., Hatton R.D., Weaver C.T. Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria. *Immunity*, 2012, vol. 37, no. 6, pp. 1061–1075. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.024
 18. Benito-Leon J., Pisa D., Alonso R., Calleja P., Diaz-Sanchez M., Carrasco L. Association between multiple sclerosis and Candida species: evidence from a case-control study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2010, vol. 29, no. 9, pp. 1139–1145. doi: 10.1007/s10096-010-0979-y
 19. Berer K., Mues M., Koutrolos M., Al Rasbi Z., Boziki M., Johner C., Wekerle H., Krishnamoorthy G. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, 2011, vol. 479, pp. 538–541. doi: 10.1038/nature10554
 20. Berer K., Gerdes L.A., Cekanaviciute E., Jia X., Xiao L., Xia Z., Liu C., Klotz L., Stauffer U., Baranzini S.E., Kumpfel T., Hohlfeld R., Krishnamoorthy G., Wekerle H. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, vol. 114, no. 40, pp. 10719–10724. doi: 10.1073/pnas.1711233114
 21. Brucklacher-Waldert V., Stuermer K., Kolster M., Wolthausen J., Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.*, 2009, vol. 132, iss. 12, pp. 3329–3341. doi: 10.1093/brain/awp289
 22. Buscarinu M.C., Cerasoli B., Annibaldi V., Policano C., Lionetto L., Capi M., Mechelli R., Romano S., Fornasiero A., Mattei G., Piras E., Angelini D.F., Battistini L., Simmaco M., Umeton R., Salvetti M., Ristori G. Altered intestinal permeability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a pilot study. *Multiple Sclerosis*, 2017, vol. 23, no. 3, pp. 442–446. doi: 10.1177/1352458516652498
 23. Cekanaviciute E., Yoo B.B., Runia T.F., Debelius J.W., Singh S., Nelson C.A., Kanner R., Bencosme Y., Lee Y.K., Hauser S.L., Crabtree-Hartman E., Sand I.K., Gacias M., Zhu Y., Casaccia P., Cree B.A.C., Knight R., Mazmanian S.K., Baranzini S.E. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, vol. 114, no. 42: e 8943. doi: 10.1073/pnas.1716911114

24. Chen J., Chia N., Kalari K.R., Yao J.Z., Novotna M., Soldan M.M., Luckey D.H., Marietta E.V., Jeraldo P.R., Chen X., Weinschenker B.G., Rodriguez M., Kantarci O.H., Nelson H., Murray J.A., Mangalam A.K. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6: 28484. doi: 10.1038/srep28484
25. Compston A., Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*, 2008, vol. 372, no. 9648, pp. 1502–1517. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7
26. Cosorich I., Dalla-Costa G., Sorini C., Ferrarese R., Messina M.J., Dolpady J., Radice E., Mariani A., Testoni P.A., Canducci F., Comi G., Martinelli V., Falcone M. High frequency of intestinal TH17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis. *Sci Adv.*, 2017, vol. 3, no. 7: e1700492. doi: 10.1126/sciadv.1700492
27. Cua D.J., Sherlock J., Chen Y., Murphy C.A., Joyce B., Seymour B., Lucian L., To W., Kwan S., Churakova T., Zurawski S., Wiekowski M., Lira S.A., Gorman D., Kastelein R.A., Sedgwick J.D. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 2003, vol. 421, no. 6924, pp. 744–748. doi: 10.1038/nature01355
28. Derrien M., Van Baarlen P., Hooiveld G., Norin E., Müller M., de Vos W.M. Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. *Front. Microbiol.*, 2011, vol. 2: 166. doi: 10.3389/fmicb.2011.00166
29. Derrien M., Vaughan E.E., Plugge C.M., de Vos W.M. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, vol. 54, pt. 5, pp. 1469–1476. doi: 10.1099/ijs.0.02873-0
30. Duhon T., Geiger R., Jarrossay D., Lanzavecchia A., Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.*, 2009, vol. 10, no. 8, pp. 857–863. doi: 10.1038/ni.1767
31. Durelli L., Conti L., Clerico M., Boselli D., Contessa G., Ripellino P., Ferrero B., Eid P., Novelli F. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann. Neurol.*, 2009, vol. 65, no. 5, pp. 499–509. doi: 10.1002/ana.21652
32. Ermolenko E., Gromova L., Borschev Yu., Voeikova A., Karaseva A., Ermolenko K., Gruzdkov A., Suvorov A. Influence of different probiotic lactic acid bacteria on microbiota and metabolism of rats with dysbiosis. *Biosci. Microbiota Food Health*, 2013, vol. 32, no. 2, pp. 41–49. doi: 10.12938/bmfh.32.41
33. Fraga-Silva T.F., Mimura L.A., Marchetti C.M., Chiuseo-Minicucci F., França T.G., Zorzella-Pezavento S.F., Venturini J., Arruda M.S., Sartori A. Experimental autoimmune encephalomyelitis development is aggravated by *Candida albicans* infection. *J. Immunol. Res.*, 2015, 2015: 635052. doi: 10.1155/2015/635052
34. Fylik H.A., Osborne L.C. The multibiome: the intestinal ecosystem's influence on immune homeostasis, health, and disease. *EbioMedicine*, 2016, vol. 13, pp. 46–54. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.10.007
35. Gaboriau-Routhiau V., Rakotobe S., Lécuyer E., Mulder I., Lan A., Bridonneau C., Rochet V., Pisi A., De Paep M., Brandt G., Eberl G., Snel J., Kelly D., Cerf-Bensussan N. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, 2009, vol. 31, no. 4, pp. 677–689. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.020
36. Ganesh B.P., Klopffleisch R., Loh G., Blaut M. Commensal *Akkermansia muciniphila* exacerbates gut inflammation in *Salmonella* Typhimurium-infected gnotobiotic mice. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 9: e74963. doi: 10.1371/journal.pone.0074963
37. Glenn J.D., Mowry E.M. Emerging concepts on the gut microbiome and multiple sclerosis. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2016, vol. 36, no. 6, pp. 347–357. doi: 10.1089/jir.2015.0177
38. Gurney A.L. IL-22, a Th1 cytokine that targets the pancreas and select other peripheral tissues. *Int. Immunopharmacol.*, 2004, vol. 4, no. 5, pp. 669–677. doi: 10.1016/j.intimp.2004.01.016
39. Hill D.A., Artis D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, vol. 28, pp. 623–667. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101330
40. Ivanov I.I., Frutos Rde L., Manel N., Yoshinaga K., Rifkin D.B., Sartor R.B., Finlay B.B., Littman D.R. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe*, 2008, vol. 4, no. 4, pp. 337–349. doi: 10.1016/j.chom.2008.09.009
41. Jangi S., Gandhi R., Cox L.M., Li N., von Glehn F., Yan R., Patel B., Mazzola M.A., Liu S., Glanz B.L., Cook S., Tankou S., Stuart F., Melo K., Nejad P., Smith K., Topçuoğlu B.D., Holden J., Kivisäkk P., Chitnis T., De Jager P.L., Quintana F.J., Gerber G.K., Bry L., Weiner H.L. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.*, 2016, vol. 7: 12015. doi: 10.1038/ncomms12015
42. Kebir H., Kreymborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A., Cayrol R., Bernard M., Giuliani F., Arbour N., Becher B., Prat A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.*, 2007, vol. 13, no. 10, pp. 1173–1175. doi: 10.1038/nm1651
43. Klemann C., Raveney B.J.E., Klemann A.K., Ozawa T., von Hörsten S., Shudo K., Oki S., Yamamura T. Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.*, 2009, vol. 174, no. 6, pp. 2234–2245. doi: 10.2353/ajpath.2009.081084
44. Korn T., Bettelli E., Gao W., Awasthi A., Jäger A., Strom T.B., Oukka M., Kuchroo V.K. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, 2007, vol. 448, no. 7152, pp. 484–487. doi: 10.1038/nature05970
45. Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W.M., Mattson J., Basham B., Sedgwick J.D., McClanahan T., Kastelein R.A., Cua D.J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, 2005, vol. 201, no. 2, pp. 233–240. doi: 10.1084/jem.20041257
46. Lee Y.K., Menezes J.S., Umesaki Y., Mazmanian S.K. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, suppl. 1, pp. 4615–4622. doi: 10.1073/pnas.1000082107
47. Levinthal D.J., Rahman F., Nusrat S., O'Leary M., Heyman R., Bielefeldt K. Adding to the burden: gastrointestinal symptoms and syndromes in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Int.*, 2013, 2013: 319201. doi: 10.1155/2013/319201
48. Liang S.C., Tan X.Y., Luxenberg D.P., Karim R., Dunussi-Joannopoulos K., Collins M., Fouser L.A. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.*, 2006, vol. 203, no. 10, pp. 2271–2279. doi: 10.1084/jem.20061308
49. Linden J.R., Ma Y., Zhao B., Harris J.M., Rumah K.R., Schaeren-Wiemers N.S., Vartanian T. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes selective death of mature oligodendrocytes and central nervous system demyelination. *mBio*, 2015, vol. 6, no. 3: e0513–14. doi: 10.1128/mBio.02513-14

50. Lock C., Hermans G., Pedotti R., Brendolan A., Schadt E., Garren H., Langer-Gould A., Strober S., Cannella B., Allard J., Klonowski P., Austin A., Lad N., Kaminski N., Galli S.J., Oksenberg J.R., Raine C.S., Heller R., Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.*, 2002, vol. 8, no. 5, pp. 500–508. doi: 10.1038/nm0502-500
51. Lubberts E. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2015, vol. 11, no. 10: 562. doi: 10.1038/nr-rheum.2015.128
52. Martins T.B., Rose J.W., Jaskowski T.D., Wilson A.R., Husebye D., Seraj H.S., Hill H.R. Analysis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine serum concentrations in patients with multiple sclerosis by using a multiplexed immunoassay. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2011, vol. 136, no. 5, pp. 696–704. doi: 10.1309/AJCP7UBK8IBVMVNR
53. Maynard C.L., Elson C.O., Hatton R.D., Weaver C.T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 2012, vol. 489, no. 7415, pp. 231–241. doi: 10.1038/nature11551
54. Mazmanian S.K., Round J.L., Kasper D.L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 2008, vol. 453, no. 7195, pp. 620–625. doi: 10.1038/nature07008
55. McFarland H.F., Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.*, 2007, vol. 8, no. 9, pp. 913–919. doi: 10.1038/ni1507
56. Mielcarz D.W., Kasper L.H. The gut microbiome in multiple sclerosis. *Curr. Treat. Options Neurol.*, 2015, vol. 17, no. 4: 344. doi: 10.1007/s11940-015-0344-7
57. Miller P.G., Bonn M.B., Franklin C.L., Ericsson A.C., McKarns S.C. TNFR2 deficiency acts in concert with gut microbiota to precipitate spontaneous sex-biased central nervous system demyelinating autoimmune disease. *J. Immunol.*, 2015, vol. 195, no. 10, pp. 4668–4684. doi: 10.4049/jimmunol.1501664
58. Miyake S., Kim S., Suda W., Oshima K., Nakamura M., Matsuoka T., Chihara N., Tomita A., Sato W., Kim S.W., Morita H., Hattori M., Yamamura T. Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to Clostridia XIVa and IV clusters. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 9: e0137429. doi: 10.1371/journal.pone.0137429
59. Montes M., Zhang X., Berthelot L., Laplaud D.A., Brouard S., Jin J., Rogan S., Armao D., Jewells V., Soullillou J.P., Markovic-Plese S. Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin. Immunol.*, 2009, vol. 130, no. 2, pp. 133–144. doi: 10.1016/j.clim.2008.08.030
60. Mulvey M.R., Doupe M., Prout M., Leong C., Hizon R., Grossberndt A., Klowak M., Gupta A., Melanson M., Gomori A., Esfahani F., Klassen L., Frost E.E., Namaka M. Staphylococcus aureus harbouring Enterotoxin A as a possible risk factor for multiple sclerosis exacerbations. *Mult. Scler.*, 2011, vol. 17, no. 4, pp. 397–403. doi: 10.1177/1352458510391343
61. Nibali L., Henderson B., Sadiq S.T., Donos N. Genetic dysbiosis: the role of microbial insults in chronic inflammatory diseases. *J. Oral Microbiol.*, 2014, vol. 6: 22962. doi: 10.3402/jom.v6.22962
62. Ochoa-Reparaz J., Mielcarz D.W., Wang Y., Begum-Haque S., Dasgupta S., Kasper D.L., Kasper L.H. A polysaccharide from the human commensal Bacteroides fragilis protects against CNS demyelinating disease. *Mucos. Immunol.*, 2010, vol. 3, no. 5, pp. 487–495. doi: 10.1038/mi.2010.29
63. Paulissen S.M., van Hamburg J.P., Dankers W., Lubberts E. The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2015, vol. 74, no. 1, pp. 43–53. doi: 10.1016/j.cyto.2015.02.002
64. 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
65. Pisa D., Alonso R., Jiménez-Jiménez F.J., Carrasco L. Fungal infection in cerebrospinal fluid from some patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013, vol. 32, no. 6, pp. 795–801. doi: 10.1007/s10096-012-1810-8
66. Round J.L., Mazmanian S. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 27, pp. 12204–12209. doi: 10.1073/pnas.0909122107
67. Rumah K.R., Linden J., Fischetti V.A., Vartanian T. Isolation of Clostridium perfringens type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 10: e76359. doi: 10.1371/journal.pone.0076359
68. Sallusto F., Zielinski C.E., Lanzavecchia A. Human Th17 subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2012, vol. 42, no. 9, pp. 2215–2220. doi: 10.1002/eji.201242741
69. Saroukolaei S.A., Ghabaei M., Shokri H., Khosravi A., Badiei A. Evaluation of APR1 gene expression in Candida albicans strains isolated from patients with multiple sclerosis. *Jundishapur. J. Microbiol.*, 2016, vol. 9, no. 5: e33292. doi: 10.5812/ijm.33292
70. Scher J.U., Sczesnak A., Longman R.S., Segata N., Ubeda C., Bielski C., Rostron J.U., Cerundolo V., Pamer E.G., Abramson S.B., Huttenhower C., Littman D.R. Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*, 2013, vol. 2: e01202. doi: 10.7554/eLife.01202
71. Sokol H., Pigneur B., Watterlot L., Lakhdari O., Bermúdez-Humarán L.G., Gratadoux J.J., Blugeon S., Bridonneau C., Furet J.P., Corthier G., Grangette C., Vasquez N., Pochart P., Trugnan G., Thomas G., Blottière H.M., Doré J., Marteau P., Seksik P., Langella P. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105, no. 43, pp. 16731–16736. doi: 10.1073/pnas.0804812105
72. Tremlett H., Fadrosch D.W., Faruqi A.A., Hart J., Roalstad S., Graves J., Spencer C.M., Lynch S.V., Zamvil S.S., Waubant E.; US Network of Pediatric MS Centers. Associations between the gut microbiota and host immune markers in pediatric multiple sclerosis and controls. *BMC Neurol.*, 2016, vol. 16, no. 1: 182. doi: 10.1186/s12883-016-0703-3
73. Tzartos J.S., Friese M.A., Craner M.J., Palace J., Newcombe J., Esiri M.M., Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.*, 2008, vol. 172, no. 1, pp. 146–155. doi: 10.2353/ajpath.2008.070690
74. Varrin-Doyer M., Spencer C.M., Schulze-Topphoff U., Nelson P.A., Stroud R.M., Cree B.A., Zamvil S.S. Aquaporin 4-specific T cells in neuromyelitis optica exhibit a Th17 bias and recognize Clostridium ABC transporter. *Ann. Neurol.*, 2012, vol. 72, no. 1, pp. 53–64. doi: 10.1002/ana.23651
75. Wacleche V.S., Goulet J.P., Gosselin A., Monteiro P., Soudeyns H., Fromentin R., Jenabian M.A., Vartanian S., Deeks S.G., Chomont N., Routy J.P., Ancuta P. New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy. *Retrovirology*, 2016, vol. 13, no. 1, pp. 59. doi: 10.1186/s12977-016-0293-6

76. Yamashita M., Ukibe K., Matsubara Y., Hosoya T., Sakai F., Kon S., Arima Y., Murakami M., Nakagawa H., Miyazaki T. *Lactobacillus helveticus* SBT2171 attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 8: 2596. doi: 10.3389/fmicb.2017.02596
77. 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 patho, gens. *Nat. Med.*, 2008, vol. 14, no. 3, pp. 282–289. doi: 10.1038/nm1720
78. Zhu E., Wang X., Zheng B., Wang Q., Hao J., Chen S., Zhao Q., Zhao L., Wu Z., Yin Z. miR-20b suppresses Th17 differentiation and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting ROR γ t and STAT3. *J. Immunol.*, 2014, vol. 192, no. 12, pp. 5599–5609. doi: 10.4049/jimmunol.1303488
79. Zielinski C.E., Mele F., Aschenbrenner D., Jarrossay D., Ronchi F., Gattorno M., Monticelli S., Lanzavecchia A., Sallusto F. Pathogen-induced human T(H)17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature*, 2012, vol. 484, no. 7395, pp. 514–518. doi: 10.1038/nature10957

Авторы:

Абдурасулова И.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник физиологического отдела им. И.П. Павлова ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры медицинской биофизики ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия;

Тарасова Е.А., научный сотрудник физиологического отдела им. И.П. Павлова ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории общей иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Негореева И.Г., к.м.н., научный сотрудник лаборатории нейробиологии ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Ильвес А.Г., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории нейробиологии ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Серебрякова М.К., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Ермоленко Е.И., д.м.н., зав. лабораторией биомедицинской микробиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Ивашкова Е.В., к.м.н., научный сотрудник лаборатории нейробиологии ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Мацулевич А.В., научный сотрудник физиологического отдела им. И.П. Павлова, ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Татаринов А.Е., зав. неврологическим отделением клиники ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Столяров И.Д., д.м.н., профессор, зав. лабораторией нейробиологии ФГБНУ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Клименко В.М., д.м.н., профессор, руководитель физиологического отдела ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Суворов А.Н., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий Факультета стоматологии и медицинских технологий СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия; зав. отделом молекулярной микробиологии, ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Abdurasulova I.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Medical Biophysics, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Tarasova E.A., Researcher, Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Negoreeva I.G., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation;

Ivles A.G., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation;

Serebryakova M.K., Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Ermolenko E.I., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Biomedical Microecology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Ivashkova E.V., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation;

Matsulevich A.V., Researcher, Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Tatarinov A.E., Head of the Neurological Department, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Stoliarov I.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Laboratory of Neuroimmunology, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain, St. Petersburg, Russian Federation;

Klimenko V.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Suvorov A.N., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, Faculty of Dentistry and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.09.2018
Отправлена на доработку 14.03.2019
Принята к печати 06.06.2019

Received 11.09.2018
Revision received 14.03.2019
Accepted 06.06.2019