

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

На правах рукописи

БОРИСОВА МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**Особенности поведения самцов мышей на моделях
хронического колита**

1.5.5. – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Кожевникова Елена Николаевна

Новосибирск

2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность темы исследования.....	6
Цель и задачи исследования	8
Научная новизна работы	8
Теоретическая и практическая значимость работы.....	9
Положения, выносимые на защиту	11
Апробация результатов	11
Основные публикации	12
Личный вклад автора	14
Объём и структура диссертации	14
Благодарности	15
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1 Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК)	16
1.1.1. Симптомы и распространенность ВЗК	16
1.1.2. Вклад генетических компонент в развитие ВЗК.....	17
1.1.3. Участие иммунной системы в развитии ВЗК	18
1.1.4. Нарушение микробиоты кишечника как причина ВЗК.....	19
1.1.5. Нарушение проницаемости кишечника при ВЗК, причина или следствие? ..	21
1.1.6. Современные подходы к лечению ВЗК	24
1.2. Сопутствующие ВЗК патологии ЦНС и изменения поведения	26
1.3. Нейрогуморальные механизмы связи головного мозга и пищеварительной системы.....	27
1.3.1. Роль иммунной системы при формировании взаимодействия в оси «кишечник-мозг».....	27
1.3.2. Метаболические соединения как посредники между кишечником и ЦНС ...	29
1.3.3. Взаимная регуляция в системе “кишечник-мозг”: роль блуждающего и спинномозговых нервов	30
1.4. Модели ВЗК на лабораторных животных.....	33
1.4.1. Модель генетически обусловленного хронического воспаления кишечника на мышцах линии <i>Muc2^{-/-}</i>	35
1.4.2. Модель хронического воспаления кишечника, химически индуцированного добавлением DSS, на мышцах.....	35
1.5. Заключение.....	36

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1. Животные	38
2.2. Проведение экспериментов на модели хронического генетически обусловленного воспаления кишечника.....	39
2.2.1. Последовательность проведения этапов эксперимента	39
2.2.2 Клиническая шкала	42
2.3. Проведение экспериментов на модели химически индуцированного хронического воспаления кишечника	43
2.3.1 Схема проведения поведенческих тестов	43
2.3.2. Предоставление рифампицина в питье	45
2.3.3. Введение 5-гидрокситриптофана (5-НТР)	45
2.4. Проведение экспериментов на модели химически индуцированного острого воспаления кишечника	46
2.5. Проведение поведенческих тестов для изучения взаимного соответствия реакций на самца и самку в контактном и запаховом тестах	46
2.6. Проведение поведенческих тестов	47
2.6.1. Получение социального и полового опыта самцами мышей.....	47
2.6.2. Поведение в домашней клетке.....	47
2.6.3. Тест «открытое поле»	47
2.6.4. Тест «темно-светлая камера»	48
2.6.5. Тест с закапыванием шариков	48
2.6.6. Ольфакторный тест (тест на распознавание запахов)	48
2.6.7. Тест на предпочтение социально значимого запаха.....	49
2.6.8. Тесты резидент-интродер	49
2.7. Измерение проницаемости барьера кишечника	49
2.8. Измерение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ).....	50
2.9. Гистологический анализ.....	50
2.10. Иммуногистохимический анализ	51
2.11. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).....	52
2.12. Измерение уровня экспрессии генов	53
2.13. Измерение уровня содержания отдельных таксонов бактерий.....	53
2.14. Метагеномный анализ кишечного микробиома.....	54
2.15. ЯМР-спектроскопия метаболитов в крови и в головном мозге	54
2.16. Статистическая обработка.....	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	56

3.1. Особенности поведения самцов мышей с генетически обусловленным хроническим воспалением кишечника (<i>Muc2^{-/-}</i>)	56
3.1.1 Выраженность колита у мышей <i>Muc2^{-/-}</i>	56
3.1.2 Проницаемость кишечного барьера и ГЭБ у мышей линии <i>Muc2^{-/-}</i>	58
3.1.3. Поведение мышей линии <i>Muc2^{-/-}</i> и однопометников <i>Muc2^{+/+}</i>	62
3.1.4. Социальное поведение мышей линии <i>Muc2^{-/-}</i> и однопометников <i>Muc2^{+/+}</i>	65
3.1.5. Особенности поведения однопометников мышей <i>Muc2^{-/-}</i> без мутации (<i>Muc2^{+/+}</i>) и самцов мышей C57BL/6 после совместного содержания	68
3.1.6. Роль микробиоты в поведении мышей <i>Muc2^{+/+}</i> и <i>Muc2^{-/-}</i>	70
3.2. Особенности поведения самцов мышей с химически индуцированным воспалением кишечника	73
3.2.1. Выраженность хронического колита у мышей после химической индукции	73
3.2.2. Социальное поведение мышей после химической индукции хронического колита совместно с предоставлением L-фукозы	76
3.2.3. Оценка выраженности воспаления после химической индукции острого колита на мышах.....	84
3.2.4. Социальное поведение мышей после химической индукции острого колита	85
3.3. Взаимное соответствие реакций на самца и самку в контактном и запаховом тестах	87
 ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	90
4.1. Взаимодействие в оси «микробиота – кишечник – мозг» на модели генетически обусловленного воспаления кишечника	90
4.1.1. Оценка нарушения кишечного барьера и анализ причин повышенной проницаемости кишечника у мышей с нокаутом гена <i>Muc2</i>	90
4.1.2. Микробиота как ключевой фактор формирования поведенческих реакций у мышей линии <i>Muc2^{-/-}</i> и их однопометников без мутации.....	91
4.1.3. Роль бактерий вида <i>A. tuciniphila</i> в регуляции поведения	92
4.1.4. Взаимосвязь микробиоты и метаболизма в контексте нарушений поведения	93
4.1.5. Особенности полового и агрессивного поведения в генетически-обусловленной модели колита	95
4.2. Влияние микробиоты на нарушения социального поведения на модели химически обусловленного воспаления кишечника	99
4.2.1. Модель воспаления и нарушения кишечного барьера у мышей с химически-индуцированным колитом	99
4.2.2. Особенности метаболизма мышей с хроническим химически индуцированным колитом	100
4.2.3. Роль микробиоты в формировании поведения у мышей после химической индукции колита	101
4.2.4. Влияние фукозы на формирование микробиологического и метаболомного профиля и поведенческих нарушений.....	103
4.2.5. Особенности поведения самцов мышей при химической индукции колита	104
4.3. Сравнительный анализ поведения в двух моделях хронического колита ..	107

4.3.1. Сравнение поведения и нейромедиаторных систем, задействованных в реализации фенотипов на двух моделях колита.....	107
4.3.2. Сравнительный анализ запаховых и контактных тестов как инструментов поиска нейрональных механизмов социального поведения	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	116
ВЫВОДЫ.....	117
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121
ПРИЛОЖЕНИЯ	149
ПРИЛОЖЕНИЕ №1	149

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это хронические заболевания ЖКТ, основными симптомами которых являются воспаление, изъязвление, нарушение кишечной проницаемости, диарея, снижение веса тела, анемия и увеличение риска развития колоректального рака [1]. Этиология этих заболеваний не ясна, однако факторы риска включают в себя генетическую предрасположенность, влияние окружающей среды и питания [2], [3]. Предполагается, что ВЗК возникает из-за нарушения взаимодействий между содержимым кишечника и слизистой оболочкой, включая изменения иммунного ответа клеток слизистой оболочки кишечника на пищевые и микробные антигены [4].

Нередко пациенты с ВЗК страдают от тревожности, депрессии, биполярного расстройства, бессонницы и других расстройств [5], [6]. При ВЗК частота встречаемости этих расстройств достоверно превышает средние популяционные показатели. Однако данные об особенностях их протекания в качестве коморбидной патологии остаются противоречивыми и недостаточно полными [7]. При лечении сопутствующих ВЗК психических расстройств применяются психотерапия и фармакологическое лечение, однако оба метода имеют побочные эффекты. Современные исследования подчеркивают, что эффективное лечение ВЗК, минимизация побочных эффектов терапии и профилактика рецидивов требуют междисциплинарного подхода с обязательным участием не только гастроэнтеролога, но и врача-психиатра [8], [9]. Требуется более точное понимание течения заболевания, ранняя диагностика и подбор индивидуальных схем лечения психических нарушений у пациентов с ВЗК, чтобы улучшить их качество жизни [7].

Для понимания механизмов взаимосвязи между воспалением кишечника и нарушениями функционирования головного мозга в настоящем исследовании были использованы две модели хронического колита на мышах. Одной из моделей стали мыши с нокаутом гена, кодирующего муцин-2 (*Muc2*). Муцин-2 – гликопротеин и основной структурный компонент гелеобразной выстилки кишечника млекопитающих [10]. Отсутствие муцина-2 приводит к непосредственному контакту бактерий с энтероцитами и возникновению воспаления [11]. У мышей с нокаутом гена, кодирующего муцин-2, наблюдаются изменения морфологии кишечных крипт и спонтанный колит [12]. Результаты исследований поведения мышей с нокаутом гена *Muc2* немногочисленны и не охватывают социальное поведение этих животных [13]. Второй моделью нарушения [Введите текст]

морфологии и функции кишечника является модель, индуцированная добавлением натриевой соли сульфата декстрана (dextran sulfate sodium salt, DSS) в питьевую воду. Предоставление DSS вызывает клиническую картину воспалительных заболеваний кишечника и нарушения целостности муцинового слоя [14]. Такое химически-индуцированное воспаление ассоциировано с поведенческими изменениями у мышей, такими как повышение тревожности, снижение двигательной активности, уменьшение продолжительности социальных взаимодействий. Поведенческие нарушения сопровождаются изменением экспрессии генов нейрпептида Y и нейротрофического фактора мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) [15], [16], [17]. Тем не менее, особенности социального поведения при непосредственном взаимодействии исследуемых животных с незнакомыми самкой и самцом после предоставления DSS до этого исследования не изучалось и не было описано в литературе. Выбор двух моделей позволяет оценить вариабельность поведенческих изменений в зависимости от причины развития воспаления.

Развитие воспаления кишечника ассоциировано с изменениями в кишечной микробиоте, которые могут быть как причиной, так и следствием ВЗК [18]. Симбионтная кишечная микробиота, несомненно, играет важную роль в организме млекопитающего, защищая организм хозяина от патогенов, участвуя в метаболизме питательных веществ и усваивании компонентов пищи [19]. При этом состояние кишечной микробиоты может влиять и на различные процессы за пределами ЖКТ, в том числе, на деятельность головного мозга [20]. Психические расстройства рассматривают не только как коморбидные заболевания, но и, в том числе, как внекишечные проявления воспалительной реакции в контексте ВЗК [21]. Для пациентов из групп с высоким риском возникновения ВЗК показано, что изменения микробиома приводят к усилению иммунного ответа, а развитие воспалительного ответа связано с нарастанием депрессивной симптоматики и дисфункции ЖКТ [22]. Связь между микробиотой и работой головного мозга показана и на лабораторных животных. Модификации микробиоты у мышей влияют на уровень тревожности [23], [24], проявление депрессивно-подобного поведения [25], [26], [27], социальное поведение [28] и выраженность ответа на стресс [29]. Изучение механизмов и путей регуляции оси «микробиота – кишечник – мозг» не только представляет интерес для описания причин изменений поведения, но и поможет разобраться в этиологии других расстройств, сопутствующих ВЗК, что позволит предложить новые пути для терапии побочных эффектов хронического колита.

[Введите текст]

Цель и задачи исследования

Цель работы: выявить особенности поведения самцов мышей с использованием моделей генетически обусловленного и химически индуцированного хронического колита и оценить вклад микробиоты кишечника и ассоциированных с ней метаболитов в регуляцию поведенческих реакций.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1) Оценить целостность кишечного и гематоэнцефалического барьеров, особенности поведения и активации нейронов вентромедиального гипоталамуса и метаболический профиль головного мозга самцов мышей на модели хронического колита, обусловленного нокаутом гена, кодирующего муцин-2.

2) Охарактеризовать особенности поведения и метаболический профиль крови самцов мышей на модели хронического колита, индуцированного потреблением натриевой соли сульфата декстрана.

3) Оценить влияние бактериальной микробиоты кишечника на поведение самцов мышей на моделях генетически обусловленного либо химически индуцированного хронического колита.

4) Изучить вклад моносахарида фукозы в регуляцию поведенческих реакций на модели хронического колита, индуцированного потреблением натриевой соли сульфата декстрана.

Научная новизна работы

В данной работе у мышей обнаружены изменения поведенческих паттернов, опосредующих взаимодействие исследуемых самцов с самцами и самками, которые ассоциированы с хроническим воспалением кишечника и изменением состава микробиоты. Для самцов мышей *Muc2^{-/-}* показано нарушение целостности кишечного и гематоэнцефалического барьеров в сравнении с контрольной линией C57BL/6. Характер изменений в поведении самцов мышей различался на двух моделях хронического воспаления. Для модели хронического воспаления, генетически обусловленного дефицитом белка муцина-2, впервые показано снижение тревожности и стереотипного поведения, увеличение продолжительности социальных контактов с самцом и доли животных, демонстрирующих садки на самца-интродера. Показано, что особенности социального поведения у самцов мышей *Muc2^{-/-}* сопровождаются изменениями в характере [Введите текст]

активации нейронов вентромедиального гипоталамуса (ВМГ) после предоставления социального стимула. Для модели химически-индуцированного хронического воспаления, вызванного предоставлением в питье DSS, впервые показано отсутствие предпочтения самцами запаха самки при отсутствии нарушений социального взаимодействия с самкой- и самцом-интродером.

Выявлено, что изменения социального поведения, обуславливающего межполовые взаимодействия, у самцов мышей с хроническим воспалением кишечника сопровождаются изменением содержания метаболитов крови и головного мозга. Показано увеличение уровня глицина в головном мозге у самцов мышей *Muc2*^{-/-} и снижение уровня триптофана в крови мышей на модели DSS-индуцированного колита.

Впервые обнаружено, что нарушения социального взаимодействия с самкой- и самцом-интродерами у самцов мышей с хроническим колитом определяются, по крайней мере отчасти, изменением кишечной микробиоты. Особенности поведения самцов мышей *Muc2*^{-/-}, в том числе, социального поведения, обуславливающего межполовые взаимодействия, ассоциированы с повышением уровня *Akkermansia muciniphila* в кишечной микробиоте, в то время как на модели DSS-индуцированного колита сдвиги предпочтений социально-значимых запахов у самцов мышей определяет снижение уровня триптофан-продуцирующих бактерий *E. coli* и *Bifidobacterium*. Показано, что моносахарид L-фукоза при предоставлении в питье изменяет состав микробиоты кишечника и восстанавливает предпочтение запаха самок самцами мышей на фоне DSS-индуцированного колита.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные могут способствовать в понимании механизмов работы оси «микробиота – кишечник – мозг». В работе показаны возможные пути воздействия микробиоты на поведение при участии глицина у самцов мышей *Muc2*^{-/-} и при участии триптофана на модели DSS-индуцированного колита. Результаты проведенного исследования расширяют представление о влиянии бактерий кишечной микробиоты на социальное поведение, обуславливающее межполовые взаимодействия, а именно на предпочтение самцами мышей социально-значимых запахов и взаимодействие самцов мышей с разнополыми интродерами.

Предложенный в данной работе в качестве потенциального пробиотика моносахарид L-фукоза может быть в дальнейшем использован как инструмент для разработки методов коррекции поведенческих нарушений у пациентов с ВЗК. Результаты экспериментов [Введите текст]

подтверждают важность оценки воздействия антибиотиков на различные системы организма млекопитающего, и в том числе, на деятельность головного мозга. Результаты, полученные в настоящем исследовании, помогут повысить осведомленность врачей гастроэнтерологического профиля о широком диапазоне сопутствующих неврологических нарушений и патологических состояний у пациентов с ВЗК.

Положения, выносимые на защиту

1. Изменение состава кишечной микробиоты мышей при хроническом воспалении, обусловленном нокаутом гена, кодирующего муцин-2, нарушает межполовые взаимодействия у самцов, а при колите, индуцированном потреблением натриевой соли сульфата декстрана, – предпочтение запаха самки.
2. Нарушения социального поведения самцов мышей, ассоциированные с хроническим колитом различного происхождения и опосредованные изменением состава кишечной микробиоты, связаны с изменением содержания аминокислот – глицина в головном мозге и триптофана в крови животных.
3. Моносахарид фукоза модулирует состав микробиоты кишечника, что приводит к повышению уровня триптофана в крови и восстановлению предпочтения запаха самки у самцов мышей с химически индуцированным колитом.

Апробация результатов

Материалы диссертации были представлены на следующих российских и международных научных конференциях в виде устных, стендовых и заочных докладов:

1. Litvinova E., Achasova K., Kozhevnikova E., **Zolotykh (Borisova) M.**, Moshkin M. The role of mucin-2 and its monosaccharides in regulation of mucosal immunity. // 5th Annual meeting of the international Cytokine & Interferon Society (ICIS). Каназава, Япония, 2017. – С. 65-66.
2. **Золотых (Борисова) М.А.** Влияние проницаемости физиологических барьеров на социальное поведение мышей. // Ломоносов-2018. Москва, 2018.
3. **Золотых (Борисова) М.А.**, Кожевникова Е.Н., Литвинова Е.А., Ачасова К.М. Поение L-фукозой нормализует социальное поведение самцов мышей при вызванном колите. // Научно-практическая конференция специалистов по работе с лабораторными животными Rus-LASA-7. Нижний Новгород, 2018.
4. Кожевникова Е.Н. **Золотых (Борисова) М.А.**, Литвинова Е.А., Снытникова О.А. Роль муцина-2 в регуляции поведения мышей. // Научно-практическая конференция специалистов по работе с лабораторными животными Rus-LASA-7. Нижний Новгород, 2018.
5. **Borisova M.A.**, Snytnikova O.A., Litvinova E.A., Achasova K.M., Pindyurin A.V., Tsentalovich Y.P., Kozhevnikova E.N. L-fucose rescues behavioral abnormalities upon chronic colitis in male mice. // 26th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and Behavior». Санкт-Петербург, 2019. – С. 40.

6. Kozhevnikova E.N., **Borisova M.A.**, Snytnikova O.A., Litvinova E.A., Tsentalovich Y.P. The role of microflora and its metabolism in regulation of social behavior in mouse models of intestinal inflammation. // 26th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and Behavior». Санкт-Петербург, 2019. – С. 41.

7. **Борисова М.А.**, Снытникова О.А., Литвинова Е.А., Ачасова К.М., Пиндюрин А.В., Центалович Ю.П., Кожевникова Е.Н. Изменения социального поведения самцов мышей при вызванном колите. // Всероссийская мультikonференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего». Новосибирск, 2019. – С. 151.

8. Кожевникова Е.Н., **Борисова М.А.**, Снытникова О.А., Васильева Н.Р., Литвинова Е.А., Ачасова К.М., Дубовский И.М. Роль микрофлоры и метаболизма в регуляции поведения на модели животных с предрасположенностью к воспалению кишки. // Всероссийская мультikonференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего». Новосибирск, 2019. – С. 175.

9. **Borisova M.**, Litvinova E., Achasova K., Kozhevnikova E. Mucin-2 deficient mice display alterations in social behaviour. // 32nd ECNP Congress. Копенгаген, Дания. 2019. – P. 479.

Основные публикации

По материалам диссертации опубликовано 14 работ в рецензируемых изданиях, из них 7 статей и 7 тезисов конференций.

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Morozova M.V., Boldyreva L.V., **Borisova M.A.**, Kozhevnikova E.N. Investigating social communication in mice: A two-intruders test approach. // Journal of Neuroscience Research. – 2024. – Vol. 102(7). doi: 10.1002/jnr.25365. Индексируется в SCOPUS и WOS.

2. Morozova M.V.*, **Borisova M.A.***, Snytnikova O.A., Achasova K.M., Litvinova E.A., Tsentalovich Y.P., & Kozhevnikova E.N. Colitis-associated intestinal microbiota regulates brain glycine and host behavior in mice. // Scientific Reports. – 2022. – Vol.12. doi:10.1038/s41598-022-19219-z. Индексируется в SCOPUS и WOS. * – Равный вклад.

3. Achasova K.M., Kozhevnikova E.N., **Borisova M.A.**, Litvinova E.A. Fucose ameliorates *Tritrichomonas* sp.-associated illness in antibiotic-treated *Muc2*^{-/-} mice. // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol 22(19). doi: 10.3390/IJMS221910699 Индексируется в SCOPUS и WOS.

[Введите текст]

4. **Borisova M.A.***, Achasova K.M.*, Morozova K.N., Andreyeva E.N., Litvinova E.A., Ogienko A.A., Morozova M.V., Berkaeva M.B., Kiseleva E., Kozhevnikova E.N. Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium. // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol.10. doi:10.1038/s41598-020-78141-4. Индексируется в SCOPUS и WOS. * – Равный вклад.

5. **Borisova M.A.**, Snytnikova O.A., Litvinova E.A., Achasova K.M., Babochkina T.I., Pindyurin A.V., Tsentalovich Y.P., Kozhevnikova E.N. Fucose ameliorates tryptophan metabolism and behavioral abnormalities in a mouse model of chronic colitis. // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 12(2). doi: 10.3390/nu12020445. Индексируется в SCOPUS и WOS.

6. Литвинова Е.А., Ачасова К.М., **Борисова М.А.**, Женило С.В., Прохорчук Е.Б., Кожевникова Е.Н. Роль гена Kaiso в развитии воспаления у мышей с дефицитом Муцина-2. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2018. – 22(8). – С. 1078-10831. doi: 10.18699/VJ18.453. Индексируется в SCOPUS, WOS, РИНЦ.

7. **Zolotych (Borisova) M.A.**, Kozhevnikova E.N. The effect of social experience on olfactory preference in male mice. // *Applied Animal Behaviour Science*. – 2017. – Vol.189. – p. 85–90. Индексируется в SCOPUS и WOS.

Тезисы конференций:

1. Litvinova E., Achasova K., Kozhevnikova E., **Zolotych (Borisova) M.**, Moshkin M. The role of mucin-2 and its monosaccharides in regulation of mucosal immunity. // 5th Annual meeting of the international Cytokine & Interferon Society (ICIS). Каназава, Япония, 2017. – С. 65-66.

2. **Золотых (Борисова) М.А.** Влияние проницаемости физиологических барьеров на социальное поведение мышей. // *Ломоносов-2018*. Москва, 2018.

3. **Borisova M.A.**, Snytnikova O.A., Litvinova E.A., Achasova K.M., Pindyurin A.V., Tsentalovich Y.P., Kozhevnikova E.N. L-fucose rescues behavioral abnormalities upon chronic colitis in male mice. // 26th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and Behavior». Санкт-Петербург, 2019. – С. 40.

4. Kozhevnikova E.N., **Borisova M.A.**, Snytnikova O.A., Litvinova E.A., Tsentalovich Y.P. The role of microflora and its metabolism in regulation of social behavior in mouse models of intestinal inflammation. // 26th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and Behavior». Санкт-Петербург, 2019. – С. 41.

5. **Борисова М.А.**, Снытникова О.А., Литвинова Е.А., Ачасова К.М., Пиндюрин А.В., Центалович Ю.П., Кожевникова Е.Н. Изменения социального поведения самцов

мышей при вызванном колите. // Всероссийская мультikonференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего». Новосибирск, 2019. – С. 151.

6. Кожевникова Е.Н., **Борисова М.А.**, Снытникова О.А., Васильева Н.Р., Литвинова Е.А., Ачасова К.М., Дубовский И.М. Роль микрофлоры и метаболизма в регуляции поведения на модели животных с предрасположенностью к воспалению кишки. // Всероссийская мультikonференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего». Новосибирск, 2019. – С. 175.

7. **Borisova M.**, Litvinova E., Achasova K., Kozhevnikova E. Mucin-2 deficient mice display alterations in social behaviour. // 32nd ECNP Congress. Копенгаген, Дания. 2019. – P. 479.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнялись гистологические и иммуногистохимические исследования (приготовление препаратов, гистологический и иммуногистохимический анализ, оценка по гистологической шкале), работа с животными (получение химически индуцированной модели хронического колита, предоставление антибиотиков в питье, оценка проницаемости кишечника и ГЭБ) в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН. Поведенческие тесты и их анализ были выполнены совместно с к.б.н. Кожевниковой Е.Н. и к.б.н. Морозовой М.В. Тест поведения в домашней клетке был выполнен к.б.н. Хоцкиным Н.В. в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН. Анализ метаболитов методом ЯМР был выполнен совместно с к.б.н. Снытниковой О.А. в Центре коллективного пользования «Масс-спектрометрические исследования» Международного томографического центра (МТЦ) СО РАН. Метагеномный анализ кишечной микробиоты был выполнен компанией Novogene (Novogene Co., Ltd., Пекин, Китай) совместно с Кожевниковой Е.Н. Анализ образцов с помощью просвечивающей электронной микроскопии был выполнен к.б.н. Морозовой К.Н. и к.б.н. Киселевой Е.В. в Центре микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН. Изображения препаратов иммуногистохимического окрашивания с антителами к белку кладин-3 получали в Центре коллективного пользования "Молекулярная и клеточная биология" Института молекулярной и клеточной биологии (ИМКБ) СО РАН.

Объём и структура диссертации

Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты, обсуждение результатов, выводы, список сокращений и список цитируемой литературы. Работа изложена на 150 страницах, содержит 25 рисунков, 8

таблиц и 2 страницы приложений к диссертации. Библиографический указатель включает 314 источников литературы.

Благодарности

Автор выражает особую благодарность научному руководителю к.б.н. Кожевниковой Елене Николаевне, к.б.н. Литвиновой Екатерине Анатольевне, к.б.н. Ачасовой Ксении Михайловне, д.б.н., профессору Мошкину Михаилу Павловичу, а также всем сотрудникам лаборатории генетики лабораторных животных за помощь в ходе проведения экспериментов и работы над диссертацией. Автор выражает особую благодарность центру коллективного пользования «Центр генетических ресурсов лабораторных животных SPF-виварий ИЦиГ СО РАН» за предоставление SPF-животных и доступ к оборудованию. Автор благодарит Центр микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН, Центр коллективного пользования «Масс-спектрометрические исследования» Международного томографического центра (МТЦ) СО РАН и Центр коллективного пользования "Молекулярная и клеточная биология" ИМКБ СО РАН за помощь в ходе выполнения экспериментальной части работы и доступ к оборудованию.

1.1 Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК)

1.1.1. Симптомы и распространенность ВЗК

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это хронические изнурительные заболевания, характеризующееся повторяющимися эпизодами усиления и ослабления воспаления в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). ВЗК включает в себя язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК). При ЯК поражается слизистая оболочка толстой кишки и характеризуется диффузным воспалением, нарушением структуры кишечных крипт и эрозией [30]. На гистологическом уровне заметно опустошение бокаловидных клеток, увеличение числа нейтрофилов в собственной пластинке слизистой и в криптах, где они образуют микроабсцессы. При БК воспаление затрагивает также мышечный слой стенки кишки и характеризуется неоднородной очаговой локализацией. БК может распространиться на любую часть ЖКТ, но чаще всего обнаруживается в терминальной части подвздошной кишки. При БК наблюдается агрегация макрофагов, которые формируют гранулемы. Симптомы ВЗК часто включают, но не ограничены, болью в абдоминальной области, диареею, ректальное кровотечение и потерю веса [31], [32]. ВЗК также считается фактором риска возникновения рака [33].

В последние десятилетия в России, как и во всем мире, наблюдается неуклонный рост заболеваемости ВЗК. Распространенность ВЗК в России составляет 19,3 – 9,8 случая на 100 тыс. населения для ЯК и 3,0 – 4,5 на 100 тыс. – для БК. По сведениям региональных регистров, распространенность ВЗК гораздо выше, чем представленная по России: в Московской области она составляет 58 случаев на 100 тыс. населения, в Республике Татарстан – 40 на 100 тыс., в Новосибирской области – 49 на 100 тыс., а в регионах, где нет единого регистра по ВЗК, от 5 до 12 на 100 тыс. населения [34]. В США и странах Западной Европы отмечаются более высокие темпы заболеваемости ЯК и БК, чем в других странах мира. В США частота ЯК и БК среди детей примерно 28 случаев на 100 тыс. населения и 40 случаев на 100 тыс. населения соответственно [32]. Чаще всего БК обнаруживается у пациентов между 20 и 30 годами, а ЯК – между 30 и 40 годами [35]. У пациентов с появлением ВЗК в раннем либо очень раннем возрасте симптоматика болезни отличается от взрослых пациентов: у близких родственников таких детей чаще встречается ВЗК, сама болезнь протекает тяжелее, больше степень устойчивости к иммуносупрессивной терапии [36].

[Введите текст]

Причина возникновения ВЗК, как и причина рецидивов после лечения и достижения ремиссии до конца не известна. Среди возможных гипотез выделяются две основные идеи. Первая гипотеза состоит в том, что изначальная дисрегуляция иммунной системы приводит к чрезмерной иммунной реакции на здоровую микробиоту. Согласно второй гипотезе, изменения состава кишечной микробиоты и/или нарушенная барьерная функция кишечного эпителия вызывает патологические реакции со стороны нормально работающей иммунной системы. Считается, что ВЗК характеризуется искаженной иммунной реакцией, однако микробиота и нарушения в эпителиальных клетках могут усиливать эту реакцию [37]. В целом, считается, что ВЗК возникает у генетически предрасположенных людей из-за одного или нескольких внешних факторов. К факторам риска заболевания также относят «западную диету» (режим питания с высоким содержанием насыщенных жиров и простых углеводов и низким содержанием клетчатки), аппендэктомия, прием нестероидных противовоспалительных лекарств и курение [35], [38], [39], [40].

1.1.2. Вклад генетических компонент в развитие ВЗК

Вклад генетических компонент в развитие ВЗК показан для более чем 200 локусов. По оценкам, вклад генетических компонент не превышает 50%, что подтверждает растущее количество случаев ВЗК, ассоциированных с индустриализацией и «вестернизацией»: ВЗК традиционно считались заболеваниями, характерными для США и стран Европы. Однако в настоящее время участились случаи заболевания ВЗК и в странах Азии. Считается, что такая тенденция включает в себя изменение пищевого рациона, окружающей среды и санитарных условий [38], [41].

Среди исследованных локусов показано 30 ЯК-специфичных и 41 БК-специфичный генетических полиморфизмов, тем не менее, 137 локусов ассоциированы и с БК, и с ЯК. От 80% до 90% идентифицированных локусов, ассоциированных с ВЗК, являются некодирующими и, вероятно, представляют собой эпигенетическим маркеры, микроРНК и некодирующую РНК [42]. Для ближайших родственников пациентов с ВЗК показано десятикратное увеличение риска развития ВЗК [43]. Некоторое количество генов, ассоциированных с ВЗК, также ассоциировано с другими аутоиммунными заболеваниями.

ВЗК, причиной которых являются одиночные мутации (моногенные ВЗК), в основном диагностируются у детей младше 6 лет. Известно около 60 одиночных мутаций, которые влияют на иммунные механизмы в патогенезе ВЗК, включая эпителиальный барьер, функции нейтрофилов, Т-клеток и В-клеток. У детей старше 7 лет и у взрослых ВЗК обычно ассоциированы с несколькими локусами, определяющими предрасположенность к заболеваниям (полигенные ВЗК), при этом значительное влияние на развитие ВЗК [Введите текст]

оказывают факторы окружающей среды [36], [44]. Моногенные формы ВЗК достаточно редко встречаются, заболевание протекает тяжело и трудно поддается лечению. У 63.4% таких пациентов ВЗК развивается до 6 лет, у 17.4% - между 10 и 18 годами, а у 10.9% - после 18 лет. Самыми часто встречающимися генами, ассоциированными с моногенными ВЗК, являются IL10RA, XIAP, CYBB, IL10RB, LRBA и TTC7A [45].

1.1.3. Участие иммунной системы в развитии ВЗК

Патогенез ВЗК включает в себя различные факторы, включая дисрегуляцию иммунных механизмов. Эпителий кишечника человека содержит цилиндрические клетки, бокаловидные клетки, клетки Панета, эндокринные клетки, М-клетки, пучковые клетки и клетки-предшественники [46]. Также в составе эпителия содержатся иммунные клетки, такие как дендритные клетки, нейтрофилы, макрофаги и лимфоидные клетки врожденного иммунитета, которые в здоровом кишечнике слабо реагируют на стимулы. Кишечная микробиота является ключевым фактором в регуляции развития и функционирования иммунной системы [47]. У GF-мышей была обнаружена гипоплазия Пейеровых бляшек, снижалось число плазматических клеток, секретирующих IgA, и CD4⁺ Т клеток в собственной пластинке слизистой оболочки и другие иммунологические дефекты. Подселение микробиоты от здоровых животных компенсировало описанные иммунологические дефициты [48]. Активация клеток собственной пластинки кишечника приводит к секреции большого количества растворимых иммуномедиаторов, провоспалительных цитокинов (ФНО, ИНФ- γ , ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-21, ИЛ-23) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, трансформирующий ростовой фактор ТРФ- β , ИЛ-35) в тканях. Макрофаги слизистой оболочки предотвращают взаимное преобразование Тх-1 и Тх-17 друг в друга с помощью продукции противовоспалительных цитокинов, таким образом способствуя дифференцировке Т-регуляторных клеток. Баланс между про- и противовоспалительными цитокинами важен для здорового состояния кишечника [49].

Начало ВЗК и их прогрессирование зависят от сложных взаимодействий генетических предпосылок, внешних триггеров и искаженной иммунной реакции. Считается, что основной вклад в развитие ВЗК со стороны иммунной системы вносит приобретенный иммунный ответ, либо через увеличение уровней провоспалительных цитокинов, продуцируемых Т-хелперами, либо из-за недостаточно эффективной работы Т-регуляторных клеток. Клетки Th-17 и лимфоидные клетки врожденного иммунитета также участвуют в патогенезе ВЗК. ЯК и БК характеризуются активацией разных типов иммунного ответа: при БК более выражена активация Т-хелперов 1 типа (Th-1) и Th-17, тогда как при ЯК доминирует Th-2 [50], [51]. Важную роль в патогенезе ВЗК играет баланс [Введите текст]

двух типов иммунных клеток: Th-17 и Т-регуляторных клеток. Клетки Th-17 считают важным звеном в развитии ВЗК, поскольку они в большом количестве содержатся в воспаленной слизистой оболочке кишки пациентов. По сравнению со здоровыми тканями, в воспаленных тканях пациентов с ВЗК повышается количество клеток, которые продуцируют цитокины Th-17 типа и ИЛ-17. Процесс дифференцировки клеток Th-17 в значительной степени зависит от состава кишечной микробиоты: у GF-животных и в присутствии антибиотиков дифференцировка Th-17 снижается. Т-регуляторные клетки в норме поддерживают баланс клеток иммунной системы, а снижение их функции приводит к развитию воспалительных заболеваний. Мутации в CD25 и ИЛ-10, которые вовлечены в дифференцировку Т-регуляторных клеток, увеличивают вероятность возникновения ВЗК [52].

Хотя точные причины возникновения ВЗК еще не выяснены, есть данные о том, генетическая предрасположенность приводит к дисрегуляции иммунной системы в слизистых оболочках, развивается чрезмерный иммунный ответ на собственную микробиоту (нарушение баланса между ответом на патогены и толерантностью к комменсальной микробиоте), который в дальнейшем вызывает хроническое воспаление и повреждения стенки кишечника [46], [49], [50]. Согласно второй гипотезе, изначальное нарушение состава микробиоты вызывает патологический ответ клеток иммунной системы. Скорее всего, патогенез ВЗК обусловлен комбинацией двух описанных гипотез [51]. Вопрос, что же первично, нарушение микробиоты или воспаление, пока остается невыясненным [39].

1.1.4. Нарушение микробиоты кишечника как причина ВЗК

Кишечная микробиота ребенка начинает формироваться с рождения. К возрасту одного года формируется бактериальный профиль, характерный для взрослого организма. Несмотря на то, что различные факторы способны влиять на кишечный микробиом (болезни, инфекции, стресс, изменения диеты), при изменении этих факторов микробиом возвращается к состоянию, которое установилось в раннем детстве [20]. Микробиота кишечника играет важнейшую роль в обеспечении работы организма хозяина. Она имеет три основные функции: 1) обеспечение метаболизма и питания с помощью продукции короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), витаминов и влияния на всасывание кальция и железа, 2) защита от инвазии патогенов и разрастания потенциально опасных резидентных видов и 3) влияние на пролиферацию и дифференцировку кишечного эпителия и на развитие и модуляцию клеток иммунной системы [53, 54]. В большинстве случаев при ВЗК наблюдаются нарушения кишечной микробиоты. Среди изменений [Введите текст]

состава микробиоты наиболее часто происходят следующие: снижение бактериального разнообразия, снижение количества бактерий типа *Firmicutes* и увеличение типа *Bacteroidetes*, снижение *Clostridium XIVA* и *IV* (*Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae*, *Clostridiumcocoides*) и увеличение *Proteobacteria* (*Enterobacteriaceae*), снижение *Faecalibacterium prausnitzii* и *Roseburia hominis*, увеличение муколитических *Ruminococcus gnavus* и адгезивно-инвазивной *Escherichia coli*, увеличение представленности грибов, в основном *Candida albicans*, увеличение *Caudovirales* [53], [55].

По результатам исследований на людях и на животных роль в развитии ВЗК играет «западная диета», богатая жирами и углеводами, что приводит к сдвигам в составе кишечной микробиоты [40]. Для «западной диеты» характерно снижение потребления клетчатки, содержащейся в овощах и фруктах. Метаболизм клетчатки в организме человека происходит с помощью бактерий. Продуктами метаболизма являются КЦЖК (ацетат, пропионат, бутират), которые модулируют функции эпителиальных и иммунных клеток в кишечнике, обеспечивая отсутствие воспаления [56]. Бутират используется клетками эпителия толстой кишки как источник энергии, а также регулирует деление клеток, продукцию противовоспалительных цитокинов и индуцирует толерогенные дендритные клетки [57]. Нарушение состава микробиоты при ВЗК влечет за собой и изменение профиля метаболитов, так у пациентов с ВЗК в фекалиях снижено содержание КЦЖК как следствие снижения количества бутират-продуцирующих *Faecalibacterium prausnitzii* и *Clostridium IV*, *XIVA* и *XVIII* [58], [59]. Известно, что *Clostridium IV* и *XIVA* стимулируют T-регуляторные клетки, а снижение количества этих бактерий при ВЗК уменьшает иммунную толерантность и отменяет сдерживание воспаления [60], [61]. Кроме того, у пациентов с ВЗК повышается количество сульфат-редуцирующих бактерий, таких как *Desulfovibrio*, что приводит к продукции сероводорода и последующему повреждению клеток эпителия, что вызывает воспаление слизистой оболочки [62].

У пациентов с ВЗК увеличивается содержание бактерий с провоспалительными свойствами. Было показано увеличение уровня адгезивно-инвазивной *E.coli* для 38% пациентов в острой фазе БК, тогда как среди здоровых людей это встречалось только у 6%. Увеличение патогенных бактерий, способных прикрепляться к эпителию кишки, влияет на проницаемость кишечника и вызывает воспаление. Количество мукозальных бактерий при ВЗК повышается даже в тех участках слизистой, где не наблюдается выраженного воспаления. Это обусловлено несоразмерным увеличением количества муколитических бактерий, к примеру *Ruminococcus gnavus* и *Ruminococcus torques*, которые обеспечивают доступный субстрат для мукозальных бактерий [58], [63].

[Введите текст]

Важным условием формирования иммунной системы в раннем возрасте являются взаимодействия иммунных клеток и микробиоты. Эти процессы происходят в определенный период и могут влиять в дальнейшем на работу иммунной системы и склонность к инфекционным и воспалительным заболеваниям в течение всей жизни [47]. Формирование иммунных клеток в кишечнике в значительной степени зависит от взаимодействия с микроорганизмами. У GF-животных отмечают скудное количество лимфоидной ткани, при этом иммунная активность практически отсутствует. Предоставление же некоторых микроорганизмов показало свою эффективность в формировании полноценного спектра иммунных функций [20]. По данным ряда исследований подселение здоровым GF-мышам микробиоты от животных с ВЗК вызывает у реципиентов симптомы ВЗК, и к тому же влечет за собой изменения в иммунной системе. У мышей, которым подсадили микробиоту от беременных женщин с ВЗК и от их детей в возрасте 90 дней, наблюдали снижение бактериального разнообразия и изменения популяций иммунных клеток в кишечнике [64]. У генетически предрасположенных к воспалению в кишечнике мышей подселение микробиоты от животных с проявлениями ВЗК вызывало воспаление по типу БК [65]. Подселение микробиоты от пациентов с ВЗК здоровым мышам приводило к увеличению уровней Th17 и Th2 клеток в кишечнике и снижало количество Т-регуляторных ROR γ t⁺ клеток по сравнению с микробиотой от здоровых доноров; подселение этой же микробиоты мышам с индуцированным колитом ухудшало течение болезни [66]. Опубликованные данные позволяют предполагать, что изменения микробиоты могут являться первичными в развитии ВЗК, что, тем не менее, требует дополнительного изучения [47].

1.1.5. Нарушение проницаемости кишечника при ВЗК, причина или следствие?

Помимо функции всасывания питательных веществ, слизистая оболочка кишки также играет роль барьера между тканями организма и внешней средой. В патогенезе ВЗК задействовано много факторов, одним из которых является нарушение взаимодействия микробиоты и стенки кишки. Нарушения в слизистой оболочке кишки зачастую сопровождаются повышением кишечной проницаемости. У пациентов с ВЗК описаны различные дефекты в слизистой оболочке кишки, от состава муцинового слоя до изменения парацеллюлярной проницаемости [67]. Нарушение барьерной функции кишечника – «синдром дырявого кишечника» – вносит значительный вклад в течение ВЗК и считается одной из мишеней для терапии [67], [68]. Повышение проницаемости кишечного барьера наблюдается как в случаях обострения воспаления из-за воздействия провоспалительных цитокинов, так и в стадии хронического заболевания [30], [67], [69], [70]. Показано, что у

[Введите текст]

близких родственников пациентов с БК повышена проницаемость кишечника в отсутствие проявлений самой болезни [71], [72]. Повышенная проницаемость кишечника также может свидетельствовать о начальной стадии БК у людей из группы повышенного риска развития заболевания [73].

Верхний слой клеток слизистой оболочки кишки представлен эпителиальными клетками, которые покрыты слоем муцина, секретируемого бокаловидными клетками. Муциновый слой обеспечивает среду для обитания микроорганизмов, не позволяя им проникать непосредственно к клеткам эпителия кишки. В эпителии тонкой кишки также встречаются клетки Панета, которые синтезируют антимикробные пептиды. Муцины и антимикробные пептиды являются частью барьера, который защищает организм хозяина от инфекций [46]. К антимикробным факторам также относится и иммуноглобулин А, секретируемый плазматическими клетками [74]. При ВЗК показано нарушение функционирования и локализации клеток Панета. При ВЗК эти клетки можно наблюдать не только в тонкой кишке, но и в толстой, где они секретируют дефенсины [67]. Увеличение экспрессии β -дефенсинов 2 и 3 при ЯК, но не при БК, свидетельствует о том, что изменение функции клеток Панета при этих двух заболеваниях имеет различный характер. Снижение антимикробной функции может индуцировать БК, тогда как увеличение секреции дефенсинов при ЯК может быть физиологическим ответом на повреждение слизистой оболочки кишки [75].

Основным компонентом муциновой выстилки кишки является муцин-2. При ВЗК изменяются секреция муцина, структура его гликопротеиновой основы, а также сульфатирование и сиалирование олигосахаридных остатков. У пациентов с ЯК снижается количество бокаловидных клеток, уменьшается толщина муциновой выстилки кишки [67], муциновая выстилка становится проницаемой для бактерий, тогда как в стадии ремиссии ЯК проницаемость муцинового слоя сравнима с уровнем в контрольной группе [11]. Для острой фазы ЯК показано снижение уровня белка MUC2 из-за недостаточного сульфатирования муцина-2 во время синтеза, а такой муцин легче деградирует [10]. Показано, что при ЯК и БК в тонкой и толстой кишке повышены маркеры стресса ЭПР. Накопление секретируемых белков неправильной структуры в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) приводит к стрессу ЭПР [76]. На мышинной модели спонтанного колита было показано, что нарушение синтеза муцина и барьерной функции кишки происходило из-за стресса ЭПР в бокаловидных клетках, вызванного нарушенной олигомеризацией муцина-2. У людей с ЯК накопление предшественника муцина-2 и стресс ЭПР наблюдались

в ткани кишки даже в отсутствие воспаления. Таким образом, неправильное сворачивание муцина-2 и стресс ЭПР может играть роль в патогенезе колита у человека [77].

Эпителиальные клетки кишки используют трансцеллюлярный и парацеллюлярный виды транспорта питательных веществ и воды. Регуляция парацеллюлярного транспорта ионов и небольших молекул, а также непрерывность слоя клеток кишечного эпителия обеспечивается межклеточными контактами трех типов: плотные контакты (ПК), адгезивные контакты и десмосомы [78]. «Синдром дырявого кишечника» ассоциирован со структурными нарушениями межклеточных контактов в эпителиальном слое кишки у пациентов с ВЗК. У пациентов с БК изменяется строение комплекса плотных контактов, снижается уровень экспрессии кладинов 3, 5 и 8 и окклюдина, повышается уровень порообразующего кладина-2, изменяется распределение кладинов 5 и 8. Похожие изменения наблюдались и при ЯК, включая снижение окклюдина и кладинов 1 и 4 и увеличение кладина-2 [79], [80], [81]. Цитокины регулируют экспрессию генов белков ПК и их функции, а также барьерные свойства слизистой оболочки. ФНО-альфа снижает количество и изменяет структуру ПК, для ИЛ-6, ИЛ-13, ИЛ-15 и ИЛ-17 показана роль в регуляции экспрессии генов белков ПК [78]. Механизм воздействия некоторых патогенных бактерий, паразитов и вирусов включает воздействие на плотные контакты, что повышает проницаемость кишки [82]. Группой Бергстрема с коллегами показано дополнительное увеличение проницаемости кишки мышей линии *Muc2*^{-/-} после заражения *Citrobacter rodentium* [83]. Предоставление патогенной *Entamoeba histolytica* мышам линии *Muc2*^{-/-} изменяет экспрессию белков плотных контактов [84]. Подселение *Bacteroides fragilis* мышам нормализовало повышенную проницаемость кишки [28]. Также изучают роль муколитических бактерий при ВЗК. У пациентов с ВЗК в участках кишки без воспаления (которые на макроскопическом и микроскопическом уровне выглядели здоровыми) было повышено количество муколитических бактерий *Ruminococcus gnavus* и *Ruminococcus torques*. Напротив, количество бактерий *Akkermansia muciniphila*, которые составляли большую долю муколитических бактерий в контроле, было снижено при ВЗК [63].

В основе ВЗК лежат несколько звеньев, нарушения в каждом из которых увеличивают вероятность возникновения болезни. Механизмы взаимодействия эпителиальных и иммунных клеток и бактерий кишечной микробиоты в ходе развития воспаления сложны и еще не до конца изучены. Изучение причин возникновения ВЗК позволяет улучшать имеющиеся виды терапии и подбирать мишени для новых лекарств.

1.1.6. Современные подходы к лечению ВЗК

ВЗК значительно влияет на качество жизни пациентов, которые нуждаются в специализированной медицинской помощи и регулярном приеме лекарственных средств. Во многих случаях и для лечения БК, и для лечения ЯК используются одни и те же варианты терапии, несмотря на различия в проявлении этих двух заболеваний. Такой подход обусловлен тем, что многие виды лечения воздействуют на медиаторы хронического воспаления, которые задействованы в обоих типах ВЗК [85]. Терапия ВЗК, направленная на регуляцию работы иммунной системы, включает в себя аminosалицилаты, кортикостероиды и иммуномодуляторы (метотрексат, азотиоприн) [74]. Лечение зачастую имеет побочные эффекты, такие как острый панкреатит и супрессия костного мозга, перфорация кишки, спонтанные кровотечения и возникновение опухолей, что может требовать колэктомии. Некоторым пациентам требуется проведение манипуляций в условиях стационара (дренаж внутрибрюшного абсцесса либо эндоскопическая баллонная дилатация) либо хирургическое вмешательство [86].

В последние десятилетия проводится поиск новых лекарственных средств, способных облегчить состояние пациентов с ВЗК. К примеру, использование в терапии антител к ФНО (anti-TNF agents) значительно улучшает качество жизни больных ВЗК. Использование анти-ФНО агентов является классическим примером терапии, направленной на цитокиновые сигналы при ВЗК. Два вида антител к ФНО используются наиболее широко: инфликсимаб (химерные мышь-человек) и адалимумаб (моноклональные гуманизированные IgG₁). Тем не менее, только у двух третей пациентов наблюдается улучшение в ответ на лечение анти-ФНО агентами. Используемые молекулы довольно большие и обладают иммуногенностью, что со временем снижает эффективность терапии. Системное распределение таких антител создает риск серьезных побочных эффектов (инфекции, аутоиммунные реакции, реакции гиперчувствительности и т.д.). Лечение имеет высокую стоимость, однако поиски маркеров, которые позволили бы предсказать, каким будет ответ на терапию ВЗК анти-ФНО агентами, пока не увенчались успехом. Усовершенствование методики включает в себя поиски различных способов доставки антител [87], [88]. В терапии ВЗК кроме использования антител к ФНО также используют антитела к интерлейкинам и антитела к интегринам. Устекинумаб, блокирующий ИЛ-12 и ИЛ-23, считается одним из наиболее перспективных новых препаратов для лечения ВЗК благодаря своей эффективности и безопасности. Использование антител к интегринам основано на блокировке эффекта хоуминга: связанные с антителами интегрины не могут узнать специфические лиганды, которые экспрессируются на клетках эндотелия, что препятствует перемещению Т-клеток

[Введите текст]

в стенку кишки. К примеру, ведолизумаб блокирует интегрин $\alpha 4\beta 7$, который связывается с молекулами клеточной адгезии типа "адрессин" в слизистых оболочках 1 (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1, MAdCAM-1), которые экспрессируются в эндотелии и венах собственной пластинки кишки [89].

Новые подходы в терапии ВЗК включают в себя не только влияние на иммунную систему, но и также восстановление состояния микробиоты и барьерной функции кишки [74]. Воздействие на микробиоту чаще всего происходит с помощью приема антибиотиков либо пробиотиков. Цель приема антибиотиков состоит в снижении нагрузки в виде эндогенных микроорганизмов, а приема пробиотиков – в воздействии на микробиоту более безопасным способом, а также в использовании бактерий с противовоспалительными свойствами. Прием антибиотиков может вызывать ремиссию в активной стадии ЯК и БК и предотвращать эпизоды усиления заболевания у пациентов с ВЗК в стадии ремиссии. По результатам рандомизированных контрольных исследований, при использовании ципрофлоксацина, смеси кларитромицин + рифабутин + клофазимин либо рифаксимина ремиссия при БК наступала значительно быстрее, чем в контрольной группе пациентов, не принимавших антибиотики [90], [91].

Механизмы действия пробиотиков (живых микроорганизмов) на организм хозяина различаются в зависимости от используемого штамма микроорганизмов. Некоторые пробиотики непосредственно демонстрируют антимикробную активность, к примеру вырабатывают молочную кислоту, гидропероксиды, бактериоцины или дефенсины. Другие конкурируют с патогенными микроорганизмами за питательные вещества, изменяют рН в кишке, увеличивают продукцию муцина, усиливают процессы восстановления тканей либо обеспечивают формирование плотных контактов, тем самым снижая проницаемость кишки. Также пробиотики участвуют в иммунном ответе, высвобождая в просвет кишки фрагменты клеточной стенки или ДНК. Результаты использования пробиотиков для терапии ВЗК противоречивы. Наблюдаемые эффекты различаются в зависимости от используемого протокола лечения и вида/штамма микроорганизмов. Также для воздействия на микробиоту используют пребиотики (поддающиеся ферментации углеводы, в основном олигосахариды и инулин). В основе терапии пребиотиками лежит их способность стимулировать определенные бактерии к синтезу полезных для организма хозяина метаболитов. Так же, как и в случае с пробиотиками, данные клинических исследований об использовании пребиотиков у пациентов с ВЗК немногочисленны [92].

Опубликованы случаи успешной трансплантации донорской микробиоты пациентам с ЯК, не поддающимся лечению стероидами и иммуномодуляторами. Через 6 недель после

[Введите текст]

процедуры пациенты смогли отказаться от противовоспалительной терапии, а в ходе дальнейшего мониторинга оставались в состоянии ремиссии [93]. Трансплантация донорской микробиоты в некоторых исследованиях приводит к выраженному улучшению состояния пациентов, однако в большинстве случаев последствия такой терапии слабо предсказуемы [39]. Успешность заселения и последующая приживаемость донорской микробиоты сильно варьируют у разных пациентов, что влияет на эффективность метода [94].

1.2. Сопутствующие ВЗК патологии ЦНС и изменения поведения

Сопутствующие ВЗК расстройства проявляются и вне ЖКТ, включая заболевания суставов, печени, желчных протоков, анемию, поражения глаз, кожи и слизистых оболочек. Как минимум одно осложнение вне ЖКТ сопровождает от 6 до 47% случаев ВЗК. Эффекты ВЗК проявляются также в центральной и периферической нервной системах. Наиболее часто встречаются периферические нейропатии, рассеянный склероз и ишемическая нейропатия зрительного нерва [95]. Пациенты с ВЗК имеют повышенный риск инсульта, в основном в периоды обострения болезни. Возникновение осложнений часто связывают с изменением работы иммунной системы. Дополнительный эффект оказывают инфекции, тромбоз, дефицит питательных веществ и витаминов и побочные эффекты лекарств (стероиды, антибиотики) [95], [96]. Среди неврологических и психических расстройств, сопутствующих ВЗК, отмечены повышенный риск возникновения депрессии, тревожности, биполярного расстройства, расстройств пищевого поведения (анорексия, булимия), а также болезни Паркинсона. Предполагают, что черепно-мозговое и системное воспаление играет роль в развитии болезни Альцгеймера и сосудистой деменции [97]. Прохождение молекул бактериальных метаболитов через стенку кишки и гематоэнцефалический барьер рассматривают как один из факторов структурных и функциональных изменений в ЦНС. Считается, что дисфункция иммунных клеток слизистой оболочки и кишечная микробиота вносят вклад в развитие воспаления, что играет роль в развитии нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона и рассеянный склероз [98].

Тот факт, что ВЗК ассоциированы с психическими расстройствами, известен довольно давно: в середине прошлого века ЯК даже считали психосоматическим заболеванием [99]. Депрессия и тревожное расстройство чаще встречаются у пациентов с хроническими заболеваниями, чем в среднем в популяции [100]. Вероятность диагностирования депрессии в течение жизни у пациентов с ВЗК составляет 40%, вероятность тревожного расстройства – 30% [101]. Сочетание ВЗК и депрессии может приводить к снижению качества жизни, менее благоприятному исходу после лечения, увеличению риска рецидива [Введите текст]

ВЗК, госпитализации и хирургического вмешательства. Показана корреляция между выраженностью симптомов ВЗК и симптомов депрессии, которые в свою очередь коррелируют с соблюдением режима терапии [22]. Около 60 – 80% пациентов с ВЗК в активной стадии отмечали расстройства настроения, тогда как среди пациентов в стадии ремиссии доля снижалась до 30%. Симптомы депрессии, например, потеря интереса к обычным ежедневным занятиям, в свою очередь могут приводить к обострениям ВЗК, если пациенты нарушают режим терапии [102]. Депрессия и тревожное расстройство могут предшествовать проявлению ВЗК и других иммуно-зависимых заболеваний. Эти психические расстройства рассматривают не только как побочный эффект хронического заболевания, но и в том числе как внекишечное проявление воспалительной реакции ВЗК [21]. У пациентов с депрессией отмечено повышение титров антител к липополисахариду Грам-отрицательных бактерий в крови по сравнению со здоровыми добровольцами [103]. У пациентов с ВЗК наблюдаются нарушения сна: увеличение времени до засыпания, фрагментированный сон, усиление усталости в дневное время и снижение качества сна по оценкам пациентов [104].

Механизмы, которые связывают ВЗК и психические расстройства, пока окончательно не установлены. Взаимное влияние процессов в кишечнике на деятельность мозга называют «ось кишечник – мозг», часто включая в этот ряд кишечную микробиоту как «ось микробиота – кишечник – мозг». Описаны основные звенья, через которые ВЗК могут влиять на головной мозг: через иммунную систему, путем изменения микробиоты и с помощью передачи сигнала по блуждающему нерву.

1.3. Нейрогуморальные механизмы связи головного мозга и пищеварительной системы

1.3.1. Роль иммунной системы при формировании взаимодействия в оси «кишечник-мозг»

Предполагается, что одно из основных звеньев, которые опосредуют воздействие иммунной системы на головной мозг – это цитокины. Цитокины или гормоны, продуцируемые иммунными клетками, могут проникать в головной мозг с кровотоком. Иммунные клетки кишечника могут напрямую взаимодействовать с афферентными сенсорными волокнами с помощью наработки цитокинов либо других медиаторов (например, гистамин), чтобы вызвать сигналы, которые в итоге поступят в головной мозг. В-третьих, циркулирующие иммунные клетки могут проникать в мозг, где они способны выделять цитокины и другие медиаторы воспаления в непосредственной близости от структур мозга [105]. Кровеносные сосуды циркумвентрикулярных органов лишены полноценного гематоэнцефалического барьера и проницаемы для молекул до 500 кДа, [Введите текст]

таких как ИЛ-1 [106]. Для психических заболеваний (к примеру, депрессия, шизофрения и биполярное расстройство) показана роль воспалительных цитокинов. Уровни интерлейкина (ИЛ) - 6 и белков острой фазы (например, С-реактивный белок) ассоциированы с увеличенным риском возникновения симптомов депрессии со временем. Симптомы депрессии также ассоциированы с активацией Т-клеток, что влечет за собой увеличение концентраций растворимых рецепторов ИЛ-2 и CD8, а также усиление активации эффекторных Т-клеток, включая увеличение уровней ИЛ-2, интерферона – γ и ИЛ-17 [21]. Воспалительные процессы на периферии сопутствуют многим нейропсихиатрическим заболеваниям. Тем не менее, воспаление на периферии может протекать тканеспецифично, а из увеличения уровня цитокинов в крови не следует однозначного увеличения их уровня в ЦНС. Предполагается, что в основе эффекта тканеспецифичности может лежать работа гематоэнцефалического барьера [107]. Согласно исследованиям с использованием GF-мышей, кишечная микробиота может влиять на проницаемость ГЭБ [108]. Данные многочисленных исследований позволяют предположить, что для некоторых неврологических нарушений, которые ранее изучали как нарушения головного мозга, первопричиной могут являться изменения в ЖКТ [109].

Иммунные клетки головного мозга – клетки микроглии – отвечают на воспалительные стимулы и вырабатывают провоспалительные цитокины и простагландины. Рецепторы к этим медиаторам находятся как на нейрональных, так и на других клетках мозга [110]. У животных, полностью свободных от микробов (germ-free, GF-животных), наблюдались нарушения в микроглии, а именно изменения пропорций клеток и их незрелый фенотип, что ослабляло врожденный иммунный ответ. Незрелые клетки микроглии также наблюдались у SPF-мышей после предоставления антибиотиков. Подселение полноценной микробиоты частично восстановило функции микроглии [111]. Клетки микроглии играют ключевую роль в формировании нейрональных контуров в ходе постнатального развития, обеспечивая удаление ненужных синапсов. Присутствие отдельных бактерий влияло на развитие и активацию микроглии: подселения в кишечную микробиоту четырех видов *Bifidobacterium spp.* оказалось достаточно для влияния на синаптическую плотность и активность нейронов [112].

Иммунная система, кишечная микробиота и ЦНС тесно связаны и взаимно влияют на работу друг друга [113]. Исследования на тканях кишки *ex vivo* продемонстрировали, что кишечная микробиота активирует нейроны кишки локально с помощью влияния на экспрессию нейрональных генов через мукозальные Th17 клетки, которые затем усиливают воспаление в ЦНС [105], [114]. Описано снижение бактериального разнообразия и

[Введите текст]

изменение состава кишечной микробиоты у пациентов с болезнью Паркинсона и рассеянным склерозом. Мутации, которые приводили к развитию болезни Паркинсона у людей, не вызывали симптомы болезни Паркинсона у мутантных мышей. Однако после инфицирования *Citrobacter rodentium* у мутантных животных развивался колит, цитотоксические Т-клетки попадали в головной мозг, и развивающаяся аутоиммунная реакция приводила к появлению симптомов болезни Паркинсона [98], [115]. Таким образом, иммунные клетки являются важнейшим звеном в регуляции связи «микробиота – кишечник – мозг».

1.3.2. Метаболические соединения как посредники между кишечником и ЦНС

Различные исследования подчеркивают связь дисфункции ЖКТ, изменения состава микробиоты и психических расстройств [116]. Метаболиты, образующиеся в ЖКТ, регулируют процессы во всем теле. Эти метаболиты относятся к различным подклассам: КЦЖК, продукты катаболизма триптофана, липиды и вторичные желчные кислоты. Факт того, что отдельные метаболиты бактерий могут значительно влиять на поведение, был показан на модели аутистического поведения мышей. Было продемонстрировано, что повышение тревожности животных было обусловлено повышением концентрации в крови бактериального метаболита 4-этилфенилсульфата (4-EPS). Предоставление мышам *Bacteroides fragilis* снижало проницаемость кишки, смягчало нарушения микробиоты, корректировало тревожное, стереотипное и коммуникационное поведение животных [28]. Основным продуктом, который производят бактерии в ходе метаболизма клетчатки – КЦЖК (ацетат, пропионат и бутират). КЦЖК используются колоноцитами и гепатоцитами в качестве источника энергии, регулируют экспрессию генов ПК, стимулируют секрецию муцина, обладают антиканцерогенным эффектом и поддерживают целостность кишечного барьера [117] и ГЭБ [108]. Содержание ацетата и бутирата в фекалиях пациентов с ЯК и БК ниже, чем в контроле, что свидетельствует об изменениях в составе микробиоты при ВЗК [118]. На молекулярном уровне КЦЖК работают как лиганды рецепторов, связанных с G-белком (GPCRs), а также влияют на экспрессию генов, ингибируя гистоновые деацетилазы. Кроме того, КЦЖК влияют на воспаление и гормональную регуляцию и взаимодействуют с афферентными волокнами блуждающего нерва. Рецепторы к КЦЖК есть в ЦНС и в периферической НС. В экспериментах на мышах введение бутирата повышало уровень экспрессии BDNF, снижало выраженность депрессивного поведения, улучшало память и обучение, смягчало дефицит социального поведения. Тем не менее, механизм действия КЦЖК на мозг до конца неясен, так как экспериментальные дозы КЦЖК значительно превышают физиологические концентрации. Более того, КЦЖК могут проникать через [Введите текст]

ГЭБ, однако в экспериментах прохождение в головной мозг КЦЖК после внутривенной инъекции было минимальным [117].

Кишечные микроорганизмы сами способны синтезировать нейротрансмиттеры и могут индуцировать их продукцию в организме хозяина. Например, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides* и *Escherichia spp.* могут синтезировать ГАМК. Также бактерии участвуют в продукции серотонина. Метаболиты бактерий (индол, КЦЖК, вторичные жирные кислоты, альфа-токоферол, р-аминобензоат и тирамин) влияют на синтез и секрецию серотонина энтерохромаффинными клетками кишки [113]. Серотонин (5-гидрокситриптамин) в основном синтезируется клетками кишечника, также его синтез проходит в головном мозге. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) не пропускает молекулы синтезированного в ЖКТ серотонина в головной мозг, однако позволяет проникать его прекурсорам. Известно, что у мышей, полностью свободных от микробов (germ-free, GF), снижены концентрации триптофана и серотонина в гиппокампе, что позволяет предположить связь между состоянием кишечной микробиоты и уровнем серотонина в головном мозге [113]. Кишечная микробиота метаболизирует триптофан до молекул, которые являются лигандами арил-гидрокарбоновых рецепторов (aryl hydrocarbon receptor, AHR) и оказывают противовоспалительный эффект в ЦНС [119]. На данный момент в большинстве случаев сложно однозначно определить путь воздействия метаболита на работу ЦНС и возможные промежуточные звенья, включенные в механизм работы всей оси «микробиота-кишечник-мозг».

1.3.3. Взаимная регуляция в системе “кишечник-мозг”: роль блуждающего и спинномозговых нервов

Регуляцию работы кишечника обеспечивают нервные пути, которые передают сигналы от ЦНС к ЖКТ и в обратном направлении, а также энтеральная нервная система (ЭНС, иначе энтерическая часть вегетативной нервной системы). Кишечник – единственный внутренний орган, который имеет свою собственную независимую нервную систему. ЭНС состоит из нервных ганглиев, соединенных нервными волокнами, и располагается в кишечной стенке в виде Ауэрбахова сплетения и Мейсснера сплетения. ЭНС регулирует моторику и пищеварительную функцию кишки. В ЭНС найдено более 20 веществ, которые могут выступать в роли нейротрансмиттеров. Предполагают, что эти нейротрансмиттеры могут передавать сигналы иммунным клеткам и изменять их функционирование. Так, известно, что ацетилхолин, серотонин и глутамат оказывают сильное тормозное воздействие на различные иммунные клетки, включая АПК и Т-клетки [98], [120]. Различные афферентные нейроны в кишке содержат нейропептиды, такие как

[Введите текст]

кальцитонин-ген-связанный пептид (calcitonin gene-related peptide, CGRP) и субстанция P (SP), которые находятся в везикулах и высвобождаются при деполяризации нейронов. Выделение CGRP и SP приводит нейрогенному воспалению, которое характеризуется расширением сосудов, транссудацией плазмы и миграцией лейкоцитов. Часть афферентных нейронов экспрессирует рецепторы TRP (каналы с транзиторным рецепторным потенциалом), которые активируются в том числе и при воспалении и ацидозе. К примеру, рецепторы TRPA1 активируются либо сенсibiliзируются эндогенными медиаторами воспаления, такими как брадикинин и простагландины. Таким образом, пептидэргические нейроны могут модулировать реакции иммунных клеток в ходе воспалительной реакции [121].

Регуляция работы ЖКТ со стороны ЦНС осуществляется с помощью блуждающего нерва (БН). БН (10 пара черепно-мозговых нервов) является смешанным нервом, то есть сочетает в себе афферентные и эфферентные волокна. С помощью этого нерва происходит регуляция при голоде, насыщении и ответе на стресс, однако различные работы показывают, что он также вовлечен в регуляцию воспаления. Эксперименты в начале XX века по гастрэктомии, которая приводила к прекращению иннервации блуждающим нервом всей области ниже желудка, свидетельствуют о последующем увеличении количества случаев психических заболеваний. Эти данные подтверждаются исследованиями вагэктомии на животных. Процедура приводила к изменениям нейрогенеза у взрослых животных, реакции на стресс и тревожного поведения, что говорит об изменениях в головном мозге аналогичным развитием психических заболеваний. Напротив, стимуляция блуждающего нерва, которую изначально использовали при лечении эпилепсии, приводила к улучшению настроения пациентов. Сейчас данный метод используется при лечении депрессии [122]. В экспериментах было показано, что подселение некоторых бактерий приводит к изменениям в поведении, при этом эффекты отсутствовали у животных после ваготомии: снижение тревожного и депрессивноподобного поведения после предоставления мышам *Lactobacillus rhamnosus* [26], коррекция социального поведения на моделях аутизма с помощью *Lactobacillus reuteri* [123], снижение тревожности с помощью *Bifidobacterium longum* [17].

Роль афферентных волокон БН в развитии воспаления обусловлена двумя механизмами. Первый механизм основан на участии БН в работе гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Афферентные волокна БН иннервируют надпочечники, где выделяются кортикостероиды, обладающие противовоспалительным действием. Суть второго механизма состоит в стимуляции афферентных волокон БН цитокинами, так как

[Введите текст]

дендритные клетки, находящиеся в параганглиях, имеют рецепторы к ИЛ-1 [124], [125]. Эфферентные волокна блуждающего нерва образуют холинэргический противовоспалительный сигнальный путь. Активация этого пути снижает уровень ФНО с помощью двух механизмов. В первом случае секреция ацетилхолина дистальных отделов блуждающего нерва воздействует на периферические макрофаги, во втором случае блуждающий нерв регулирует работу селезенки с помощью селезеночного нерва. Активацию холинэргического противовоспалительного пути используют для снижения уровня ФНО при таких заболеваниях как экспериментальный сепсис, послеоперационная кишечная непроходимость, колит с помощью низкочастотной (5 Гц) стимуляции эфферентов блуждающего нерва [124].

Большое количество клинических наблюдений и экспериментально полученных данных свидетельствует в пользу того, что при многих заболеваниях, причиной которых считали нарушения в ЦНС, следует оценивать и влияние нарушений процессов в ЖКТ [20].

1.3.4. Микробиота как ключевой модулятор взаимодействия мозга и кишечника

В последние десятилетия интенсивно изучается роль и важность кишечной микробиоты для работы всего организма. Кишечная микробиота играет важнейшую роль в развитии и функционировании иммунной системы, регуляции моторики кишки, поддержки кишечного барьера и всасывания питательных веществ. Первые бактерии после рождения ребенок получает от матери. Собственная микробиота, изначально схожая с материнской, формируется в течение первого года жизни ребенка. Считают, что у здоровых людей есть стабильные компоненты микробиоты, которые сохраняются даже при изменении диеты и воздействии других факторов окружающей среды, однако могут измениться в состоянии болезни [116], [126].

Для изучения влияния микробиоты на организм используют GF-животных, полностью свободных от микробов. У GF-мышей наблюдаются усиленный ответ на стресс [29], изменение концентраций моноаминов в крови и головном мозге [127], [128]. Показаны отличия в поведении GF-мышей по сравнению с SPF-животными. У GF-мышей наблюдалось снижение тревожного поведения и увеличение двигательной активности по сравнению с SPF-животными [129], [130]. Трансплантация кишечной микробиоты GF-мышам от пациентов с депрессией приводила к депрессивно-подобному поведению, изменению метаболизма углеводов и аминокислот, тогда как трансплантация микробиоты от здоровых людей не вызывала поведенческих изменений [131]. В исследовании с использованием мышей с конвенциональной микробиотой и GF-мышей, показано, что отсутствие микробиоты приводило к увеличению размеров миндалин и гиппокампа,

[Введите текст]

изменению длины дендритов и морфологии шипиков. Изменения поведения и реакции на стресс у GF-мышей могут быть обусловлены структурными изменениями в миндалине и гиппокампе [132]. У GF-мышей аксоны нейронов префронтальной коры (ключевой области в реализации тревожного и социального поведения) были гипермиелинизированы. У этих животных возрастали уровни экспрессии генов, связанных с миелинизацией и с пластичностью миелина. Наблюдаемый эффект исчезал после подселения конвенциональной микробиоты [133].

Все больше исследований демонстрируют важность кишечного микробиома в развитии и регуляции систем энергетического метаболизма, нейроэндокринной системы и иммунной системы. И хотя многие механизмы еще предстоит установить, новые исследования также описывают роль микробиоты в развитии и функционировании энтеральной нервной системы и головного мозга [20].

Воспалительные процессы в кишечнике могут приводить к широкому спектру побочных эффектов, включая и влияние на головной мозг. В лабораторной практике для подробного изучения механизмов ВЗК широко используются модели ВЗК на лабораторных животных.

1.4. Модели ВЗК на лабораторных животных

Для изучения ВЗК было создано большое количество моделей на лабораторных животных: только с помощью генной инженерии с 1993 года было создано более 70 модельных линий мышей [134]. Несмотря на то, что лабораторные модели не отражают всю сложность заболевания у человека и не заменяют исследования с использованием материалов пациентов, они являются ценными инструментами для изучения многих важных аспектов заболеваний, которые трудно оценить у людей, такие как патофизиологические особенности на ранних стадиях колита. Большинство моделей ВЗК на лабораторных животных основаны либо на направленном воздействии на гены, либо на химической индукции, либо на переносе иммунных клеток, и лишь в некоторых моделях заболевание развивается без каких-либо внешних манипуляций [135].

К примеру, одной из используемых в исследованиях моделью ВЗК является модель с нокаутом в гене, кодирующем интерлейкин (ИЛ)-2. ИЛ-2 синтезируется активированными Т-лимфоцитами, связывается с рецепторным комплексом и запускает сигнальный каскад. У мышей с нокаутом в гене ИЛ-2 не наблюдается отклонений в тонком кишечнике, тогда как в толстой кишке наблюдаются изъязвления и утолщение стенки. Недостаток ИЛ-2 у мышей приводит к хроническому воспалению в слизистой оболочке толстой кишки, что схоже с проявлениями ЯК [136].

[Введите текст]

Другой хорошо исследованной моделью ВЗК с использованием нокаутных животных является модель на мышах с нокаутом в гене, кодирующем ИЛ-10. Ген регуляторного цитокина ИЛ-10 считается геном предрасположенности к развитию ВЗК у детей и взрослых. У мышей с нокаутом в гене ИЛ-10 в возрасте 3 месяца и старше спонтанно развивается колит, признаки которого похожи на БК [134]. Гистологическими признаками колита у мышей с дефицитом ИЛ-10 являются инфильтрации воспалительных клеток в собственную пластинку и подслизистую основу слизистой оболочки кишки, гиперплазия эпителия, уменьшение выработки муцина, абсцессы крипт, язвы и утолщение стенки кишечника. ИЛ-10 является ключевым иммунорегуляторным цитокином, который необходим для нормального функционирования кишечника, и в норме секретируется большим количеством иммунных клеток, например, макрофагами, дендритными клетками и Т-лимфоцитами [137]. Точный механизм, который приводит к воспалению в кишечнике в отсутствие ИЛ-10, неизвестен, но, скорее всего, это результат нарушения симбиотических отношений между кишечной микробиотой и хозяином [138].

Модели химически индуцированного колита популярны в исследовательской практике, поскольку они позволяют достаточно легко и быстро получить требуемые проявления ВЗК. Одна из популярных моделей химически индуцированного колита основана на ректальном введении 2,4,6-тринитробензенсульфоновой кислоты (ТНБС). ТНБС является гаптеном и обладает способностью вызывать иммунный ответ. Ректальное введение раствора ТНБС в этиловом спирте индуцирует острое кишечное воспаление с вовлечением Т-клеток. При ТНБС-вызванном колите происходит инфильтрация слизистой оболочки кишки Т-хелперами, нейтрофилами и макрофагами, появляется жидкий стул, снижается вес тела животных [139].

Модели адаптивного переноса Т-клеток позволяют исследовать ранние иммунологические события, связанные с воспалением кишечника. Перенос $CD45RB^{high}CD4^{+}$ Т-клеток от здоровых доноров мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (ТКИД) приводил к развитию летального истощения, миграции воспалительных клеток и повышению продукции воспалительных цитокинов в толстой кишке реципиента. Развивающийся в течение 5–8 недель хронический колит был дозозависимым, и, несмотря на наличие перенесенных Т-клеток в нескольких органах, значительная патология была ограничена толстым кишечником. Несмотря на то, что большинство моделей ВЗК на мышах не отражают в полной мере всю сложность ВЗК у пациентов, изучение особенностей каждой мышинной модели позволило расширить наши

знания о причинах заболеваний и предоставило цели для разработки новых методов лечения [140].

1.4.1. Модель генетически обусловленного хронического воспаления кишечника на мышах линии *Muc2*^{-/-}

При ЯК муциновый слой, который защищает клетки эпителия кишки от непосредственного контакта с бактериями, заметно истончен [12]. В качестве одной из моделей используют мышей с нокаутом в гене, кодирующем кишечный муцин-2 (линия *Muc2*^{-/-}). Муцин-2 – гликопротеин, вырабатывается бокаловидными клетками эпителиальной выстилки кишечника [10] и имеет разветвленную структуру. Отсутствие муцина-2 приводит к изменению состава микробиоты, непосредственному контакту бактерий с энтероцитами, возникновению воспаления и аденом в кишечнике [11], [141]. Около 80% массы муцина представлено боковыми цепями полисахаридов, которые добавляются к белку муцину-2 в ходе О-гликозилирования и содержат терминальные моносахариды, такие как фукоза и сиаловая кислота. Бактерии кишечника используют фукозу в качестве источника энергии [142], также она служит фактором вирулентности [143]. К примеру, *Bacteroides thetaiotaomicron* секретируют фукозидазы для отщепления остатков фукозы от муцина и последующего ее использования [144], [145]. *Escherichia coli* не секретирует фукозидазы и не способна отщеплять фукозу самостоятельно, но может использовать свободную фукозу из просвета кишечника, что необходимо *E.coli* для роста и размножения [146]. Таким образом, отсутствие муцина - 2 приводит к уменьшению содержания фукозы в просвете кишки, что сказывается на состоянии кишечного бактериального сообщества. Поведение (двигательная активность и кратковременная память) мышей *Muc2*^{+/-} и *Muc2*^{-/-} ранее было исследовано только одной группой авторов [13], в контексте пренатального воздействия гербицида глифосата. Барнетт и соавторы показали влияние глифосата на поведение мышей *Muc2*^{+/-} по сравнению с контрольной группой мышей *Muc2*^{+/-} в отсутствие воздействия гербицида. Сравнения поведенческих особенностей мышей групп *Muc2*^{+/-} и *Muc2*^{-/-} в данной публикации представлено не было.

1.4.2. Модель хронического воспаления кишечника, химически индуцированного добавлением DSS, на мышах

Наиболее часто используемая модель химически индуцированного колита на мышах основана на добавлении DSS в питьевую воду. DSS – это водорастворимый сульфатированный полисахарид, молекулярный вес которого варьирует от 5 до 1400 кДа [139]. Наиболее выраженные симптомы колита у мышей, которые схожи с симптоматикой у человека, можно наблюдать после предоставления 40-50 кДа DSS в питьевой воде.

[Введите текст]

Механизм действия DSS включает его связывание со среднецепочечными жирными кислотами в толстой кишке, что приводит к разрушению эпителия и воспалению [147]. Поение здоровых мышей раствором DSS вызывает жидкий стул, появление крови в фекалиях, снижение веса тела, в гистологических исследованиях выявляют воспаление с множественными очагами эрозии и инфильтрацией лейкоцитов [148]. Данная модель удобна в использовании и хорошо воспроизводима [149]. Варьируя концентрацию DSS и частоту предоставления DSS в питье, можно смоделировать острое, хроническое либо рецидивирующее течение кишечного воспаления [150]. На модели DSS-индуцированного колита у животных отмечали поведенческие особенности. У мышей наблюдались тревожное поведение, снижение двигательной активности, уменьшение социальных взаимодействий, изменения экспрессии генов нейропептида Y и нейротрофического фактора мозга (BDNF) [15], [16]. DSS-индуцированный колит ассоциирован с изменениями процессов распознавания и тревожным поведением, при этом данные изменения нормализовались как после уменьшения воспаления, так и после предоставления пробиотиков [152].

1.5. Заключение

Используемые в исследовательской практике модели ВЗК на мышах успешно воспроизводят характерные особенности ВЗК, включая нарушения за пределами ЖКТ. На различных моделях ВЗК опубликованы данные об изменениях в ЦНС и в поведении мышей, изменения уровней экспрессии генов в головном мозге, изменения метаболизма. Описано несколько возможных механизмов, с помощью которых изменения микробиоты приводят к нарушениям работы ЦНС [151].

Ежегодно публикуются новые исследования о встречаемости психических нарушений у пациентов с ВЗК. Для некоторых сопутствующих расстройств проявления нарушений охарактеризованы довольно подробно, например, тревожность и депрессия. Тем не менее, спектр психологических проблем, возникающих у пациентов с ВЗК, довольно широк, и существует необходимость в изучении различных особенностей поведения, которые могут сопровождать пациентов в течение продолжительной терапии заболеваний кишечника. Различные поведенческие нарушения описаны и на лабораторных животных – моделях ВЗК. Тем не менее, исследований агрессивного и полового поведения у мышей на модели колита ранее проведено не было.

Для более глубокого понимания взаимодействия между кишечником и мозгом необходимы дальнейшие исследования. Изучение взаимосвязей, лежащих в основе оси «микробиота – кишечник – мозг», обозначит путь к новым методам лечения. Выявление конкретных групп бактерий, которые играют существенную роль в развитии поведенческих нарушений при ВЗК, позволит разработать диагностические и терапевтические методы, основанные на данных о микробиоте. Описание потенциальной роли пребиотиков в регуляции оси «микробиота – кишечник – мозг» на моделях с использованием лабораторных животных в дальнейшем позволит предложить пути коррекции побочных симптомов ВЗК в клинической практике.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Животные

Эксперименты проводились в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН. Все экспериментальные процедуры были одобрены межинститутской биоэтической комиссией, протокол №18.4 от 14.10.2013. Все использованные животные имели SPF-статус, что подтверждалось в ходе ежеквартальных проверок в соответствии с рекомендациями FELASA [153].

Эксперименты проводили с использованием мышей линии C57BL/6JNskrc - потомков линии C57BL/6J, которых разводили в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН [154] (далее по тексту C57BL/6) и мышей линии *Muc2*^{-/-}. Мышей линии *Muc2*^{-/-} получали с помощью редеривации мышей линии *Muc2*^{tm1Avel}/*Muc2*^{tm1Avel} [141] на генетическом фоне мышей линии C57BL/6 [12]. Редеривацию проводили с использованием самок линии CD1, далее проводили возвратные скрещивания на линию C57BL/6. Мышей линии *Muc2*^{-/-} и их однопотомков дикого типа (*Muc2*^{+/-}) получали из скрещиваний самцов и самок *Muc2*^{+/-} (Рисунок 1). В поведенческих тестах в качестве интродеров использовали мышей линии BALB/cNskrc - потомков линии BALB/cJ, которых разводили в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (далее по тексту BALB/c).

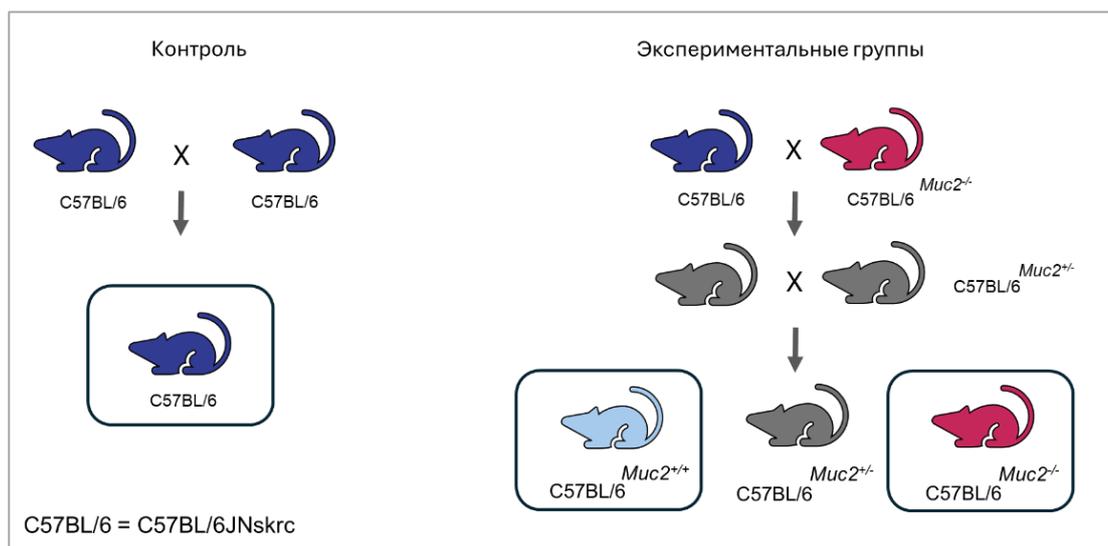


Рисунок 1. Группы мышей, использованных для экспериментов на модели генетически обусловленного хронического колита (обведено черными рамками).

Всех животных отсаживали от матерей в возрасте 3 недель и содержали однополыми группами (5 – 6 животных) в открытых клетках. В возрасте 8 недель животных рассаживали в индивидуально-вентилируемые клетки (Optimice, AnimalCare Systems) с использованием [Введите текст]

березовых опилок в качестве подстила. Самцов и самок мышей линии BALB/c содержали однополыми группами (по 3 - 5 животных в клетке) в индивидуально вентилируемых клетках. Всех животных содержали в условиях день/ночь 14ч/10ч (выключение света в 16:00) при температуре 22–24 °С, влажности 30–60%, частоте обмена воздуха 14–16 раз в час; со свободным доступом к воде и пище (гранулированный корм sSniff, Германия). Замену клеток проводили каждые 7 дней, за исключением 24 ч. перед поведенческими тестами. Все поведенческие эксперименты проводили между 16:00 и 20:00 (темное время суток). После проведения всех тестов животных выводили из эксперимента с помощью ингаляции углекислого газа, после чего проводили забор образцов для последующего анализа.

В условиях SPF-вивария у мышей линии *Muc2^{-/-}* появлялись признаки колита еще до отсадки от матерей, а у некоторых животных развивался пролапс прямой кишки, значительно снижались активность и вес тела. Животные с такими признаками не использовались в наших исследованиях.

Эксперимент по совместному содержанию самцов мышей *Muc2^{+/+}* и C57BL/6 проводили для того, чтобы контролировать влияние возможных мутаций, которые потенциально могли возникнуть у животных *Muc2^{+/+}* в результате получения пяти поколений животных *Muc2^{+/-}*. Животных получали следующим образом: самок *Muc2^{+/-}* скрещивали с самцами *Muc2^{+/-}*. Самок C57BL/6 скрещивали с самцами C57BL/6. Беременных самок *Muc2^{+/-}* и C57BL/6 содержали в отдельных открытых клетках, расположенных рядом друг с другом, при этом дважды в неделю загрязненный подстил из клеток *Muc2^{+/-}* переносили в клетки C57BL/6 и наоборот. После отсадки от матерей самцов *Muc2^{+/+}* и C57BL/6 маркировали, ссаживали и содержали совместно до окончания проведения поведенческих тестов.

2.2. Проведение экспериментов на модели хронического генетически обусловленного воспаления кишечника

2.2.1. Последовательность проведения этапов эксперимента

В эксперименте использовали самцов мышей линии C57BL/6 в качестве контрольной линии, самцов мышей линии *Muc2^{-/-}* и их однопотомков дикого типа *Muc2^{+/+}*. Для проведения поведенческих тестов животных в возрасте 8 недель рассаживали в отдельные клетки, далее животные получали половой и социальный опыт, как описано в разделе 2.6.1. Для каждого поведенческого теста самцов C57BL/6, *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}* тестировали в один день. Перерыв между тестами составлял не менее 3 дней. Животных выводили из

[Введите текст]

эксперимента с помощью ингаляции углекислого газа. При необходимости забора крови для метаболомного анализа с помощью ЯМР животных выводили из эксперимента декапитацией. Образцы головного мозга, толстой кишки и фекальных масс забирали для последующего анализа.

Животных разделили на группы для удобства проведения поведенческих тестов. Последовательность проведения поведенческих тестов, количество животных для каждого теста, а также количество образцов, забранных для проведения анализов указано в Таблицах 1 – 6. Для анализа результатов теста открытого поля, теста «темно-светлая камера», теста с закапыванием шариков и теста на предпочтение социально значимого запаха объединяли результаты групп 1 и 2. Для анализа результатов тестов с одним или двумя интродерами объединяли результаты групп 3 и 4.

Таблица 1. Последовательность проведения поведенческих тестов, количество использованных животных и количество забранных образцов, группа 1.

День	Тест	Количество животных		
		C57BL/6	<i>Muc2^{+/+}</i>	<i>Muc2^{-/-}</i>
Всего		10	9	10
1	Оценка по клинической шкале	8	8	8
2	Тест открытого поля	10	9	10
6	Тест «темно-светлая камера»	10	9	10
14	Тест с закапыванием шариков	10	9	10
18	Тест на предпочтение социально значимого запаха	10	8	10
Забор образцов:				
	Иммуногистохимическое окрашивание кишки	6	-	6
	Гистология (нисходящая толстая кишка)	6	5	6
	Метагеномный анализ кишечного микробиома	4	4	4
	Анализ количества бактерий (фекалии)	10	9	10
	Просвечивающая электронная микроскопия	2	-	2

Таблица 2. Последовательность проведения поведенческих тестов, количество использованных животных, группа 2.

День	Тест	Количество животных		
		C57BL/6	<i>Muc2^{+/+}</i>	<i>Muc2^{-/-}</i>

[Введите текст]

Всего		11	9	8
1	Тест открытого поля	10	9	8
5	Тест «темно-светлая камера»	10	8	8
13	Тест с закапыванием шариков	10	9	8
17	Тест на предпочтение социально значимого запаха	11	-	2

Таблица 3. Последовательность проведения поведенческих тестов, количество использованных животных и количество забранных образцов, группа 3.

День	Тест	Количество животных		
		C57BL/6	<i>Muc2</i> ^{+/+}	<i>Muc2</i> ^{-/-}
Всего		22	17	14
1	Тест с одним интродером (самкой)	8	-	8
5	Тест с одним интродером (самцом)	8	-	8
9	Тест с двумя интродерами Подсчет количества атак и садок на интродеров	22	17	14
Забор образцов:				
	Иммуногистохимическое окрашивание головного мозга	12	-	13

Таблица 4. Последовательность проведения поведенческих тестов, количество использованных животных, группа 4.

День	Тест	Количество животных		
		C57BL/6	<i>Muc2</i> ^{+/+}	<i>Muc2</i> ^{-/-}
Всего		11	10	10
1	Тест с одним интродером (самкой)	8	-	8
5	Тест с одним интродером (самцом)	8	-	8
9	Тест с двумя интродерами Подсчет количества атак и садок на интродеров, оценка продолжительности социальных контактов	11	10	10

Таблица 5. Последовательность проведения поведенческих тестов в эксперименте с совместным содержанием животных C57BL/6 и *Muc2^{+/+}*, количество использованных животных, группа 5.

День	Тест	Количество животных	
		C57BL/6	<i>Muc2^{+/+}</i>
Всего		10	10
1	Тест открытого поля	10	10
5	Тест «темно-светлая камера»	10	10
13	Тест с закапыванием шариков	10	10
17	Тест с двумя интродерами	10	10

Таблица 6. Количество использованных животных для каждого метода, при этом каждый эксперимент проводился на отдельной группе животных.

Тест	Количество животных		
	C57BL/6	<i>Muc2^{+/+}</i>	<i>Muc2^{-/-}</i>
Всего	41	21	41
Оценка поведения в домашней клетке	11	-	9
ЯМР (кровь)	10	10	10
ЯМР (мозг)	6	5	5
Измерение кишечной проницаемости	6	6	9
Измерение проницаемости ГЭБ	8	-	8

2.2.2 Клиническая шкала

Для оценки состояния самцов мышей использовали клиническую шкалу, описанную ранее двумя группами исследователей [12], [155] с некоторыми модификациями. Животных взвешивали, оценивали внешний вид животного и состояние стула. Каждый параметр оценивали в баллах по шкале:

- Снижение веса: 0 – отсутствует, 1 – 0–17%, 2 – 18–35%, 3 – > 35%.
- Диарея: 0 – оформленный стул, 1 – мягкий стул, 2 – диарея.
- Кровь в фекалиях: 0 – отсутствует, 1 – визуально заметна кровь в прямой кишке, 2 – визуально заметна кровь на шерсти.
- Общее состояние: 0 – оживленное/обычное, 1 – сгорбленность, 2 – вялость, апатичность, 3 – малоподвижное.

[Введите текст]

Потерю веса у мышей линий *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}* рассчитывали, принимая вес самцов мышей линии C57BL/6 того же возраста как 100%. Максимальная суммарная оценка по данной шкале, таким образом (Суммарная оценка), равнялась 10 баллов.

2.3. Проведение экспериментов на модели химически индуцированного хронического воспаления кишечника

2.3.1 Схема проведения поведенческих тестов

В исследовании с моделированием хронического воспаления путем поения DSS самцов мышей линии C57BL/6 разделили на 4 группы. Контрольная группа («Контроль») получала питьевую воду, группа «DSS» получала в питье 2% декстрансульфат натрия (DSS, NeoFroxx, Германия) в питьевой воде, группа «DSS + фукоза» получала 2% DSS в питьевой воде с добавлением 0,1% фукозы (Carbosynth, США), группа «Фукоза» получала 0,1% фукозу в питьевой воде. Концентрацию фукозы для данного исследования подбирали исходя из ее содержания в кишке млекопитающих [143]. Самцов мышей поили по описанной схеме в течение 7 дней, после чего питьевые растворы заменяли на воду еще на 7 дней. Цикл поения повторяли три раза, что в итоге составляло шесть недель хронического поения DSS (42 дня), после чего проводили поведенческие тесты (42-45 день). Животных взвешивали дважды в неделю. Также самцы мышей получали социальный и половой опыт, как описано в разделе 2.6.1. На 46 день самцов мышей декапитировали, собирали образцы крови для исследования с помощью метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Образцы нисходящей толстой кишки фиксировали в 10% забуференном формалине для гистологического исследования либо замораживали в жидком азоте для измерения уровня экспрессии генов. Фекалии собирали и хранили при -20°C для последующего анализа количества бактерий.

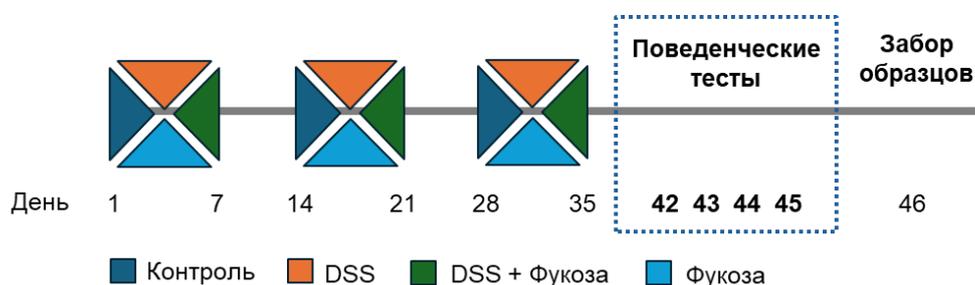


Рисунок 2. Схема поения и проведения исследований на модели хронического химически индуцированного колита на мышах.

Поведенческие тесты проводили в следующем порядке: тест открытого поля (ОП, 42 день), ольфакторный тест (тест на распознавание запахов, 43 день), тест на предпочтение

[Введите текст]

социально значимого запаха (44 день) и тест с двумя интродерами (45 день). Количество использованных животных представлено в таблице 7.

Таблица 7. Количество животных в каждой экспериментальной группе на модели хронического химически индуцированного колита на мышах.

Количество животных для каждой группы	Контроль	DSS	DSS + фукоза	Фукоза	Введение 5-НТР	Рифампицин
Всего	15	15	14	13	14	15
Взвешивание	10	10	10	10		
Тест открытого поля	10	10	10	10	14	15
Ольфакторный тест	9	9	10	10	14	15
Тест на предпочтение социально значимого запаха	15	15	14	13	14	15
Тест с двумя интродерами	9	9	10	8		
Гистология (нисходящая толстая кишка)	6	6	6	6		
Измерение уровня экспрессии генов (нисходящая толстая кишка)	6	6	6	6		
ЯМР (кровь)	7	7	9	7		
Анализ количества бактерий (фекалии)	10	10	10	9		

Для измерения проницаемости кишки формировали отдельные группы: «Контроль», n = 6, «DSS», n = 6, «DSS + фукоза», n = 6, «Фукоза», n = 8. Животных содержали группами по 3-4 самца в одной клетке. Животные получали питье по схеме на Рисунке 3 в течении 42 дней, после чего проводили измерение проницаемости кишки согласно методике п.2.6.

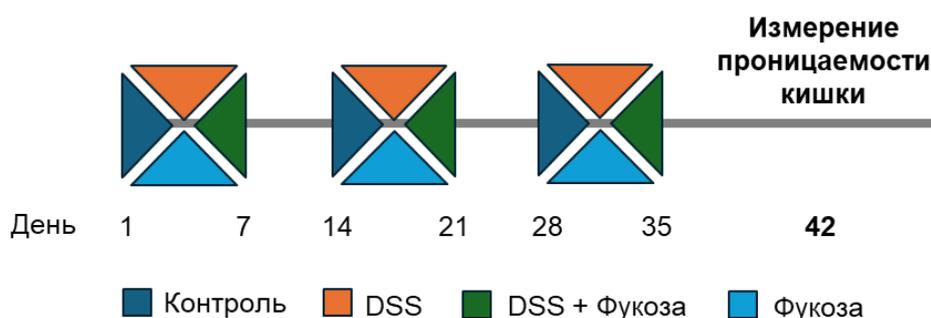


Рисунок 3. Схема поения и проведения измерения проницаемости кишки на модели хронического химически индуцированного колита на мышах.

2.3.2. Предоставление рифампицина в питье

Самцы линии C57BL/6 группы «Контроль + рифампицин» с половым и социальным опытом получали рифампицин в питьевой воде в концентрации (0,075 мг/мл, Белмедпрепараты, Беларусь) в течение 13 дней. После 7 дней поения проводили поведенческие тесты в следующем порядке: тест на предпочтение социально-значимого запаха (день 8), тест «Открытое поле» (день 12) и тест на распознавание запахов (день 13). На 14 день животных выводили из эксперимента. Количество животных показано в Таблице 7.



Рисунок 4. Схема поения рифампицином и проведения поведенческих тестов на мышах.

2.3.3. Введение 5-гидрокситриптофана (5-НТП)

Самцы мышей C57BL/6 группы «DSS + 5-НТП» получали 2% DSS в питьевой воде, а также половой и социальный опыт, как описано в разделе 2.3.1. и представлено на Рисунке 1. Поведенческие тесты проводили начиная с 42 дня. За полтора часа до каждого теста самцам внутрибрюшинно вводили 5-НТП (40 мг/кг веса тела, Sigma) в фосфатном буфере (PBS). На 45 день животных выводили из эксперимента. Количество животных показано в Таблице 7.

[Введите текст]

2.4. Проведение экспериментов на модели химически индуцированного острого воспаления кишечника

Самцов мышей линии C57BL/6 (n = 24) рассаживали в индивидуальные клетки, после чего самцы получали половой и социальный опыт, как описано выше. Далее для моделирования острого кишечного воспаления самцов мышей разделили на 4 группы следующим образом: контрольная группа («Контроль», n = 6) получала питьевую воду, группа «Острый DSS» (n = 6) получала в питье 2% натриевую соль сульфата декстрана (DSS, NeoFroxx, Германия) в питьевой воде, группа «Острый DSS + фукоза» (n = 6) получала 2% DSS в питьевой воде с добавлением 0,1% фукозы (Carbosynth, San Diego, CA, USA), группа «Фукоза» (n = 6) получала 0,1% фукозу в питьевой воде. Самцов мышей поили по описанной схеме в течение 7 дней. На 8 день проводили тест на предпочтение социально-значимого запаха, после чего самцов декапитировали и забирали образцы нисходящей толстой кишки. Образцы толстой кишки фиксировали в 10% забуференном формалине для гистологического исследования либо замораживали в жидком азоте для измерения уровня экспрессии генов.

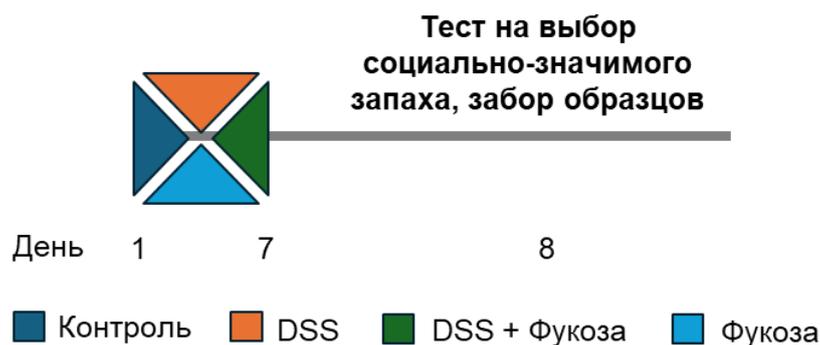


Рисунок 10. Схема поения и проведения исследований на модели острого химически индуцированного колита на мышах.

2.5. Проведение поведенческих тестов для изучения взаимного соответствия реакций на самца и самку в контактном и запаховом тестах

Для того, чтобы оценить воспроизводимость полученных результатов с помощью использованной методики, был проведен сравнительный анализ показателей тестов, полученных в разные годы соискателем и соавторами. Для проведения экспериментов самцов мышей C57BL/6 в возрасте 10-12 недель рассаживали в индивидуальные клетки и содержали с самками в течение 23 ± 2 дней для получения полового опыта. Далее самцов отсаживали в чистые клетки и содержали отдельно в течение 7 дней до проведения поведенческих тестов. Для проведения поведенческих тестов были использованы 4 отдельные группы самцов. Для группы №1 (n = 9), группы №2 (n = 10) и группы №3 (n = 11) проводили тест на выбор социально-значимого запаха и тест с двумя интродерами. Для [Введите текст]

группы №4 (n = 10) проводили тест с двумя интродерами. Для всех исследованных животных подсчитывали продолжительность контакта с обоими интродерами, количество атак и садок на интродеров. Для животных группы №3 дополнительно подсчитывали продолжительность назо-назальных и аногенитальных обнюхиваний, груминга и преследования обоих интродеров [156].

2.6. Проведение поведенческих тестов

2.6.1. Получение социального и полового опыта самцами мышей

Известно, что у мышей опыт социальных взаимодействий с другими животными определяет формирование нейрональных контуров, ответственных за регуляцию социального поведения [157], и влияет на результаты последующих социальных тестов [158]. Поведение самцов мышей с половым опытом в тестах с социальными запахами отличается от поведения наивных самцов мышей [159]. Считается, что совместное содержание самца с самкой либо наличие полового опыта вносит значительный вклад в развитие у самца более выраженного ощущения доминирования [160].

Для увеличения воспроизводимости результатов поведенческих тестов использовали самцов мышей, имеющих половой опыт. Для получения полового опыта каждого самца ссаживали с самкой линии BALB/c на две недели (в исследовании поведения мышей линии *Misc2^{-/-}*), либо на 10 дней суммарно (в исследовании поведения мышей после хронического предоставления DSS), либо на 7 дней (в исследовании поведения мышей после острого предоставления DSS). Опыт социального взаимодействия с самцом проводили в домашней клетке животного. Незнакомого самца линии BALB/c помещали в клетку резидента на 30 минут. Через 30 минут самца-резидента отсаживали в чистую клетку.

2.6.2. Поведение в домашней клетке

Поведение в домашней клетке оценивали с помощью системы автоматизированного фенотипирования PhenoMaster в соответствии с инструкциями производителя. Самцов мышей содержали в индивидуальных клетках в течение трех дней. Двигательную активность, потребление воды и корма, продолжительность сна оценивали на вторые и третьи сутки содержания. Считалось, что животное спит, если в течение 40 секунд или дольше не было зафиксировано его движений [161].

2.6.3. Тест «открытое поле»

Самца мыши помещали у бортика пластиковой арены диаметром 1 м и позволяли свободно перемещаться по арене в течение 5 минут. Все передвижения животного фиксировали с помощью программы EthoStudio [162]. Общая исследовательская [Введите текст]

активность представлена как процент исследованной площади от всей площади арены. Путь выражен в метрах, пройденных за время теста. Время в центре представлено как процент времени, в течение которого животное находилось в центральной части арены, от всего времени теста. Принципы обработки информации в программе Ethostudio описаны В.А. Куликовым с соавторами [162], [163].

2.6.4. Тест «темно-светлая камера»

Тест "темно-светлая камера" используется для оценки тревожного поведения, исследовательской и двигательной активности. Арена для проведения теста представляла собой ящик (42 × 21 × 25 см), разделенный на темный отсек (одна треть) и освещенный отсек (две трети). Между отсеками было отверстие 3 × 4 см. Животное помещали в середину темного отсека и затем в течение 5 минут фиксировали перемещение в освещенном отсеке с помощью видеокамеры. Для анализа данных (пройденный путь, время и количество входов в освещенный отсек) использовали программное обеспечение Ethovision XT10 [164], [165].

2.6.5. Тест с закапыванием шариков

Тест с закапыванием шариков используется для оценки повторяющихся действий, которые могут быть проявлением аутичного поведения либо тревожного поведения. 20 стеклянных шариков диаметром 1 см равномерно раскладывали на поверхности слоя чистых опилок (толщина слоя 4 см) в новой клетке (37 см × 21 см × 15 см). Животное помещали в клетку и позволяли свободно перемещаться по клетке в течение 30 минут, затем животное возвращали в домашнюю клетку и подсчитывали количество шариков, закопанных как минимум на две трети.

2.6.6. Ольфакторный тест (тест на распознавание запахов)

Тест на распознавание несоциального запаха часто проводят с использованием пищевого стимула с привлекательным запахом [166]. Данный тест проводился в домашней клетке животного. За трое – четверо суток до проведения теста животным в клетку помещали собачий корм для ознакомления. Сухой собачий корм использовался как привлекательный стимул, поскольку он содержит больше белка и жира, чем обычный корм для мышей, и имеет сильный запах. За 18 часов до теста животных взвешивали, из клеток убирали корм. В ходе теста животному в разные углы клетки помещали два чайных ситечка (Ikea, арт. № 469.568.00): в одном находились гранулы собачьего корма, в другом – аналогичного цвета бусины. Животному позволяли перемещаться по клетке и обнюхивать ситечки в течение 5 минут. Время обнюхивания каждого ситечка фиксировали с помощью

[Введите текст]

секундомеров. Обнюхивание отмечали только при наличии характерных движений носа и вибрисс. Данные представлены как (время обнюхивания корма либо бусин)/(общее время обнюхивания обоих образцов) и выражено в процентах.

2.6.7. Тест на предпочтение социально значимого запаха

Данный тест проводился в домашней клетке животного. В ходе теста животному в разные углы клетки помещали два ситечка с загрязненным подстилом – березовыми опилками: в одном находился подстил из клетки самок линии BALB/c, в другом – подстил из клетки самцов линии BALB/c. Животному позволяли перемещаться по клетке и обнюхивать ситечки в течение 5 минут. Время обнюхивания каждого ситечка фиксировали с помощью секундомеров. Данные представлены как (время обнюхивания запаха самца либо самки)/(общее время обнюхивания обоих образцов) и выражено в процентах. Животных – доноров запаха – содержали однополыми группами по 5 особей в клетке без смены подстила в течение 7 дней. Стадии эстрального цикла самок в группе доноров не анализировали.

2.6.8. Тесты резидент-интродер

Самцов мышей содержали в отдельных клетках как минимум в течение 3 дней до дня теста. В домашнюю клетку к самцу-резиденту на 15 минут помещали незнакомых интродеров: самца линии BALB/c, либо эстральную самку линии BALB/c, либо одновременно и самца, и самку [140]. Поведение животных в ходе теста записывали на видеокамеру. Количество атак и садок на обоих интродеров подсчитывали вручную в ходе теста. Продолжительность и количество социальных контактов (назо-назальные и аногенитальные обнюхивания, груминг, преследование) подсчитывали вручную с использованием видеозаписей. Последовательность проведения тестов была следующей: тест с самкой – интродером, тест с самцом-интродером, тест с двумя интродерами с перерывом минимум 2 дня между тестами.

2.7. Измерение проницаемости барьера кишечника

Проницаемость стенки кишечника измеряли с помощью внутрижелудочного введения 100 мкл 4-kDa FITC-Dextran (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 20 мг/мл в дистиллированной воде [83]. Через 4 часа после введения FITC-Dextran у животных собирали образцы крови из ретроорбитального синуса. 200 мкл крови добавляли к 200 мкл PBS с 0,5% добавлением гепарина и центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 15 минут при +4 °C. 100 мкл супернатанта переносили на 96-луночную плашку и измеряли флуоресценцию FITC (485 нм/535 нм) с помощью флуориметра Spark 10 M (Tecan Trading [Введите текст])

AG, Швейцария). В качестве контроля использовали образцы плазмы мышей после внутрижелудочного введения дистиллированной воды ($n = 4$ для каждого генотипа). Уровень флуоресценции, детектируемый в образцах плазмы контрольных животных, вычитали из значений флуоресценции в плазме после внутрижелудочного введения FITC-Dextran. Концентрации FITC-Dextran определяли с помощью стандартных кривых, полученных с помощью последовательных разведений FITC-Dextran.

2.8. Измерение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ)

Проницаемость гематоэнцефалического барьера оценивали по содержанию 4 kDa FITC-Dextran в коре левого полушария. 100 мкл 4 kDa FITC-Dextran в концентрации 20 мкг/мл вводили интраперитонеально, затем животное наркотизировали инъекционно (домитор, 75 мкл/10 г веса, золетил, 60 мкл/10 г веса). Через 15 минут после введения FITC-Dextran проводили перфузию фосфатным буфером через сердце для удаления крови из ткани мозга. Образцы коры головного мозга взвешивали, гомогенизировали в дистиллированной воде из расчета 100 мкл на 10 мг ткани на комнатной температуре пластиковыми гомогенизаторами, центрифугировали 30 минут при 10000 об/мин и отбирали супернатант. 100 мкл супернатанта переносили на черную 96-луночную плашку и измеряли уровень флуоресценции на планшетном флуориметре Spark 10M.

2.9. Гистологический анализ

Образцы нисходящей толстой кишки мышей фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заключали в парафин ($n = 5 - 6$ для каждой группы). Срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью ШИК-реакции (БиоВитрум, Россия) для изучения общей морфологии и выявления секрета бокаловидных клеток либо азур-2-эозином для дифференцированной окраски воспалительных клеток. Фотографии препаратов получали с использованием микроскопа AxioImager.M2 и цветной камеры AxioCam 305 (Zeiss, Германия) в ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН. Количество эпителиальных клеток в крипте толстой кишки подсчитывали на срезах, окрашенных с помощью ШИК-реакции. Гиперплазию эпителия оценивали как увеличение количества клеток в крипте относительно среднего количества клеток в крипте кишки контрольной группы [83]. Полиморфноядерные клетки (эозинофилы и нейтрофилы) подсчитывали на срезах, окрашенных азур-2-эозином, при увеличении в 1000 раз для оценки выраженности воспаления [167]. Нарушения целостности эпителия определяли как деформацию и разрежение слоя клеток, эрозии или изъязвления.

В исследовании влияния нокаута в гене муцина-2 использовали следующую шкалу (описано у Barthel с коллегами [167] и Bergstrom с коллегами [83] с модификациями):

- Гиперплазия (0: < 10%; 1: 10–50%; 2: 51–100%; 3: > 100%),
- Нарушения целостности эпителия (0: патологические изменения отсутствуют; 1: слущивание эпителия; 2: эрозия эпителиального слоя (разрыв эпителиального слоя, от 1 до 10 клеток); 3: изъязвление эпителия (разрыв эпителиального слоя более, чем на 10 клеток),
- Инфильтрация полиморфоядерных клеток (0: < 0,8 клеток на поле зрения, 1: 0,9–3,2 клеток на поле зрения; 2: 3,3–9,6 клеток на поле зрения; 3: > 9,6 клеток на поле зрения).
- Итоговая оценка - суммарная оценка трех вышеописанных показателей патологических изменений. Максимальная суммарная оценка составляла 9 баллов.

В эксперименте с кишечным воспалением, химически индуцированным DSS, степень повреждения эпителия кишки оценивали по системе, описанной в работе Bergstrom и соавторов [83] и Ichikawa и соавторов [168] со следующими изменениями:

- Гиперплазия (0: <10%; 1: 10–50%; 2: 51–100%; 3: >100%),
- Инфильтрация полиморфоядерных клеток по всей площади среза (0: нет, 1: слабая, 2: средняя, 3: высокая),
- Процент эпителия, подверженного эрозии (Эрозия) (0: <1 %, 1: 1–15 %, 2: 16–30 %, 3: 31–45 %, 4: 46–100 %).
- Итоговая оценка - суммарная оценка трех вышеописанных показателей патологических изменений. Максимальная суммарная оценка составляла 10 баллов.

2.10. Иммуногистохимический анализ

Активацию нейронов оценивали с помощью иммуногистохимического окрашивания с антителами к маркеру активации нейронов, белок c-Fos, по методике Lee с соавторами [169] с изменениями. Самцов мышей до проведения исследования содержали в индивидуальных клетках. Животному в домашней клетке предоставляли стимул на 10 минут (самец-интродер, самка-интродер либо салфетка с нейтральным запахом (лимон)). Через час животное наркотизировали с помощью инъекции домитора (75 мкл/10 г веса; Orion Pharma, Финляндия) и золетила (60 μ L/10 g weight; Virbac Sante Animale, Франция).
[Введите текст]

Далее проводили интракардиальную перфузию фосфатным буфером (15 мл) и 10% формалином (15 мл) и извлекали головной мозг. Образцы мозга фиксировали в 10% формалине в течение 12 часов, обезвоживали в 15% сахарозе в течение суток, затем в 30% сахарозе в течение суток. Срезы толщиной 30 мкм приготавливали на замораживающем микротоме (Microm HM 550, ThermoScientific, США). Окрашивание проводили с помощью первичных антител к белку c-Fos (Santa Cruz, США) и вторичных антител с флуоресцентной меткой (AlexaFluor 546, Invitrogen, США), ядра клеток окрашивали DAPI. Количество активированных нейронов подсчитывали на срезах мозга в вентромедиальном ядре гипоталамуса (ВМГ), ядра ВМГ картировали согласно атласу Allen Brain Atlas [170]. Изображения получали с помощью микроскопа ZEISS AxioScope и программного обеспечения ZEN software. Количество c-Fos-позитивных клеток подсчитывали на двух срезах для каждого образца мозга, затем значения усредняли для каждого животного. Подсчет проводили с помощью программы ImageJ. Количество активированных нейронов оценивали следующим образом: количество c-Fos⁺ клеток в образце (стимул – интродер самец/самка) - количество c-Fos⁺ клеток в образце (стимул – запах лимона).

Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к белку плотных контактов кладин-3 проводили следующим образом (n = 6). Самцов мышей наркотизировали с помощью инъекции домитора (75 мкл/10 г веса; Orion Pharma, Финляндия) и золетила (60 мкл/10 г веса; Virbac Sante Animale, Франция). Далее проводили интракардиальную перфузию фосфатным буфером (15 мл) и 10% формалином (15 мл) [171]. Образцы нисходящей толстой кишки фиксировали в 10% формалине в течение 12 часов, обезвоживали в 15% сахарозе в течение суток, затем в 30% сахарозе в течение суток. Срезы толщиной 100 мкм приготавливали на замораживающем микротоме (Microm HM 550, ThermoScientific, США). Окрашивание проводили с помощью первичных антител к белку кладин-3 (Abcam, Великобритания) и вторичных антител с флуоресцентной меткой (AlexaFluor 488, ThermoFisher Scientific), ядра клеток окрашивали DAPI. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа LSM 710 (ZEISS, Германия) и программного обеспечения ZEN software.

2.11. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).

Образцы нисходящей толстой кишки (n = 2 для C57BL/6 и *Muc2^{-/-}*) фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида в 0,1М какодилатном буфере (pH = 7,4) в течение часа при комнатной температуре и затем фиксировали в 1% тетроксиде осмия с 0.8% ферроцианидом калия в течение часа. Фиксированные образцы контрастировали с 1% уранилацетатом, обезвоживали и заливали в эпоксидную смолу (Epon 812). Полутонкие [Введите текст]

срезы окрашивали метиленовым синим и анализировали с помощью микроскопа Axioscope-4 (Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы (60 нм) для просвечивающей электронной микроскопии получали с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica, Австрия). Изображения получали с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM1400 (JEOL, Япония) [172].

Измерения клеточных структур проводили в эпителиальных клетках из средней части крипт толстой кишки с помощью программного обеспечения iTEM (OlympusSIS, Германия) на случайно выбранных срезах (от 30 до 100 независимых измерений каждой структуры на каждый генотип). Плотные и адгезивные контакты считали нарушенными, если появлялись «пузыри» либо было заметно явно выраженное расширение. Для измерения ширины ПК проводили три измерения для одного ПК. Для измерения ширины АК проводили до 10 измерений на каждый АК. Десмосомы подсчитывали на одной латеральной мембране клетки и считали нарушенными, если они имели вид «половины десмосомы». Межклеточное пространство измеряли как расстояние между мембранами двух соседних клеток в 100 участках, выбранных случайным образом для каждой группы.

2.12. Измерение уровня экспрессии генов

РНК выделяли из образцов нисходящей толстой кишки с помощью реактива TRIzol (Invitrogen, США) по инструкции производителя. Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (ThermoScientific, США). 1 мкг РНК использовали в реакции обратной транскрипции. Синтез кДНК проводили с добавлением M-MuLV обратной транскриптазы (СибЭнзим, Россия) по протоколу производителя. ПЦР в реальном времени проводили с использованием BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (2x) (БиоЛабМикс, Россия), 5 мкл кДНК и 250 нМ праймеров. Амплификацию и детекцию проводили с использованием CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, США). Уровни экспрессии генов нормировали на уровень экспрессии гена β -тубулина (*Tubb5*, *tubulin*, *beta 5 class 1*) как $\Delta Ct = 2^{-(Ct_{\text{мРНК Tubb5}} - Ct_{\text{мРНК исследуемого гена}})}$. Последовательности праймеров, использованных в данной работе, приведены в Приложении №1

2.13. Измерение уровня содержания отдельных таксонов бактерий

ДНК выделяли из образцов фекалий с использованием набора QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Германия) по инструкции производителя. Концентрации ДНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (ThermoScientific, США). Измерение уровня содержания отдельных таксонов бактерий проводили с помощью ПЦР в реальном времени [173]. Измерение содержания бактерий вида *Enterococcus* проводили с использованием [Введите текст]

коммерческого набора Cat. #ESPP96S (BBT-LAB, Россия). Измерение содержания триптофан-продуцирующих бактерий *E. coli*, рода *Bacteroides*, рода *Bifidobacterium* и универсальной области 16S рНК проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Реакцию ПЦР проводили с использованием BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (БиоЛабМикс, Россия), 5 мкл ДНК из фекалий и 300 нМ праймеров. Данные нормировали на уровень 16S рНК как $\Delta C_t = 2^{(C_{t16S} - C_{t\text{исследуемой бактерии}})}$, показано как $\log_{10}(\Delta C_t)$. Последовательности праймеров, использованных в данной работе, приведены в Приложении №1.

2.14. Метагеномный анализ кишечного микробиома

Для проведения анализа ДНК выделяли из образцов фекалий животных с помощью набора QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Германия), следуя протоколу производителя. Последующую пробоподготовку проводили в компании Novogene (Китай), что включало в себя амплификацию регионов V4, V3-V4, V4-V5 гена 16S рНК, подготовку библиотек, секвенирование на платформе Illumina и анализ данных.

2.15. ЯМР-спектроскопия метаболитов в крови и в головном мозге

Животных декапитировали и собирали образцы крови. Образцы оставляли на комнатной температуре на 15 минут, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут, отбирали сыворотку и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Экстракцию метаболитов из сыворотки крови проводили по ранее описанному протоколу [174]. К 100 мкл сыворотки добавляли 100 мкл метанола (Scharlau, Испания) и 100 мкл хлороформа (Scharlau, Испания). Образцы перемешивали, оставляли на льду на 10 минут и инкубировали на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут. Образцы центрифугировали при 12000 об/мин при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут, чтобы собрать белки. Верхнюю гидрофильную фракцию собирали и лиофилизировали на вакуумном концентраторе.

Головной мозг извлекали, разрезали сагиттально пополам и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Образцы ткани мозга взвешивали и гомогенизировали стеклянным гомогенизатором в смеси вода/метанол/хлороформ в соотношении 1:2:2 при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Образцы перемешивали, оставляли на льду на 10 минут и инкубировали на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут. Образцы центрифугировали при 12000 об/мин при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут, чтобы собрать белки. Верхнюю гидрофильную фракцию собирали и лиофилизировали на вакуумном концентраторе.

Экстракты растворяли в 600 мкл D₂O (99.9%, Cambridge Isotope Laboratories Inc., США), содержащей 6 мкМ натрий 4,4-диметил-4-силапентан-1-сульфонат (Cambridge Isotope Laboratories Inc., США) в качестве внутреннего стандарта и 20 мМ [Введите текст]

дейтерированный фосфатный буфер (pH = 7,4). Анализ проводили с помощью ЯМР спектрометра AVANCE III HD 700 MHz (Bruker BioSpin, Германия) [175]. Обработку проводили с использованием программного обеспечения MestReNova v12.0. Определение сигналов метаболитов подтверждали с помощью добавления в образцы оригинальных соединений с использованием базы данных Human Metabolome Database [176]. Концентрации метаболитов определяли с помощью интегрирования области пика по отношению к внутреннему стандарту [175], [177], [178].

2.16. Статистическая обработка

Полученные выборки данных проверяли на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Нормально распределенные выборки обрабатывали с помощью t-критерия Стьюдента, двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA), и дисперсионного анализа повторных измерений (repeated measures ANOVA). Для обработки данных, не соответствующих нормальному распределению, использовали критерий Краскела-Уоллеса (Kruskal-Wallis ANOVA), *U*-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney *U* test) для независимых образцов, критерий Уилкоксона (Wilcoxon Matched Pairs test) для зависимых образцов, критерий χ^2 и точный тест Фишера. Для анализа результатов теста с двумя интродерами использовали метод главных компонент. Для сравнения времени обнюхивания или времени контакта с интродером внутри экспериментальных групп (самец/самка либо образец корма/бусины) использовали t-критерий Стьюдента для зависимых образцов.

Все данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, кроме данных по представленности бактерий (в таких случаях представлены индивидуальные значения для каждого образца). Для контроля ошибки первого рода при проведении множественных сравнений использовали поправку Бенджамини-Хохберга.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Особенности поведения самцов мышей с генетически обусловленным хроническим воспалением кишечника (*Muc2^{-/-}*)

3.1.1 Выраженность колита у мышей *Muc2^{-/-}*

Модель хронического кишечного воспаления на мышах с нокаутом в гене, кодирующем муцин-2, уже ранее была охарактеризована в ряде публикаций [12], [141]. Для мышей линии *Muc2^{-/-}* характерны такие проявления ВЗК как снижение веса тела, диарея и пролапс прямой кишки. Поскольку показано, что условия содержания животных могут влиять на проницаемость кишечника [179], прежде всего было проведено исследование выраженности воспаления у мышей C57BL/6 и *Muc2^{-/-}* в условиях содержания в SPF-виварии. Гистологические признаки воспаления в толстой кишке мышей оценивали по шкале, приведенной выше. У животных с нокаутом гена *Muc2* наблюдались признаки хронического воспаления (Рисунок 6 А), тогда как у мышей контрольной линии C57BL/6 патологических изменений не наблюдалось (Рисунок 6 А). В эпителии кишки мышей линии C57BL/6 в большом количестве присутствовали бокаловидные клетки, заполненные ШИК+ секретом (Рисунок 6А). Клетки эпителия кишки мышей C57BL/6 образовывали непрерывный слой, изъязвления и эрозии отсутствовали (оценка по шкале = 0, Рисунок 6А). В эпителии кишки мышей линии *Muc2^{-/-}* наблюдалось хроническое воспаление с усиленной пролиферацией колоноцитов и присутствием полиморфоядерных клеток (Рисунок 6А). Бокаловидные клетки кишки мышей *Muc2^{-/-}* не содержали ШИК+-содержимого, что является следствием нокаута гена, кодирующего секреторный муцин-2 (Рисунок 6А). Степень гиперплазии эпителия и инфильтрация ПМЯ-клетками были достоверно выше для мышей линии *Muc2^{-/-}*, чем для контрольной линии C57BL/6 (гиперплазия: $Z = 2.80$, $p = 0.012$, ПМЯ клетки: $Z = 2.28$, $p = 0.022$, суммарная оценка: $Z = 2.80$, $p = 0.012$, *U*-критерий Манна-Уитни, Рисунок 6Б). Изъязвления и эрозии эпителия толстой кишки, тем не менее, отсутствовали у мышей линии *Muc2^{-/-}* (оценка по шкале = 0, Рисунок 6Б), что свидетельствует об умеренно выраженном воспалении. Общая картина, наблюдаемая в гистологических образцах кишки мышей линии *Muc2^{-/-}*, подтверждает развитие воспалительного процесса на фоне нарушения формирования защитной выстилки слизистой оболочки. У мышей *Muc2^{+/+}* не наблюдалось признаков кишечного воспаления, а оценки по гистологической шкале не отличались от оценок у контрольной линии C57BL/6 (Рисунок 6 А, Б). Степень гиперплазии эпителия и инфильтрация ПМЯ-клетками были [Введите текст]

достоверно выше для мышей группы *Muc2^{+/+}*, чем для линии C57BL/6 (гиперплазия: $Z = 2.65$, $p = 0.012$, ПМЯ клетки: $Z = 2.28$, $p = 0.022$, суммарная оценка: $Z = 2.80$, $p = 0.012$, U -критерий Манна-Уитни, Рисунок 6Б).

Для описания состояния животных использовали оценку клинических признаков: потеря веса, наличие диареи, крови в фекальных массах и общее состояние и подвижность животного. У мышей линии C57BL/6 и группы *Muc2^{+/+}* не наблюдалось проявлений клинической картины хронического воспаления (Рисунок 6Г), тогда как у мышей линии *Muc2^{-/-}* наблюдались достоверное снижение веса тела по сравнению с C57BL/6 ($*** = p < 0.001$, U -критерий Манна-Уитни) и диарея ($*** = p < 0.001$, U -критерий Манна-Уитни). Суммарная оценка по клинической шкале у мышей линии *Muc2^{-/-}* была достоверно выше, чем у C57BL/6 ($*** = p < 0.001$, U -критерий Манна-Уитни). У одной мыши из выборки было отмечено присутствие крови в фекалиях. Общее состояние животных *Muc2^{-/-}* не отличалось от такового самцов мышей контрольной линии C57BL/6. Пролапса прямой кишки не наблюдалось ни у одного из исследованных животных.

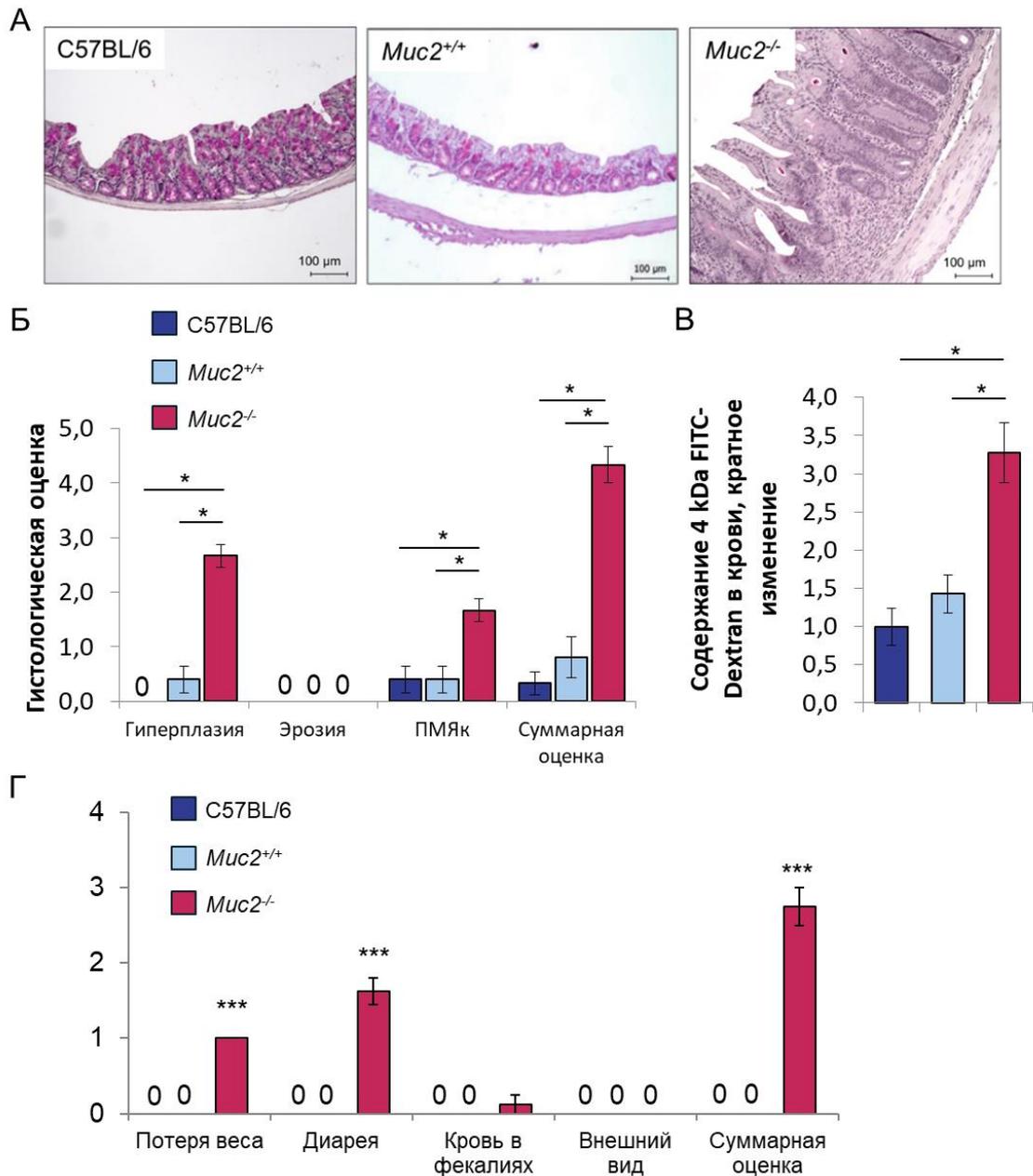


Рисунок 6. Выраженность хронического воспаления в толстой кишке мышей *Muc2*^{-/-} в условиях SPF-вивария. А. Гистологические срезы нисходящей толстой кишки, ШИК-окраска. Шкала 100 мкм. **Б.** Гистологическая оценка патологических изменений в кишке, * = $p < 0.05$. ** = $p < 0.01$, *U*-критерий Манна-Уитни. **В.** Оценка уровня проницаемости кишечной стенки по содержанию FITC-Dextran 4 kDa в плазме крови * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *U*-критерий Манна-Уитни. **Г.** Оценка состояния мышей по клинической шкале. *** = $p < 0.001$ по сравнению с C57BL/6, *U*-критерий Манна-Уитни.

3.1.2 Проницаемость кишечного барьера и ГЭБ у мышей линии *Muc2*^{-/-}

Еще одним признаком хронического воспалительного процесса в кишечнике является увеличение проницаемости кишечной стенки. Оценку проницаемости проводили с [Введите текст]

помощью введения FITC-Dextran 4-kDa внутрижелудочно с последующим измерением интенсивности флуоресценции этого маркера в плазме крови мышей. В норме FITC-Dextran 4-kDa не проникает из кишки в кровь, однако, стенка кишки мышей линии *Muc2^{-/-}* была проницаема для FITC-Dextran ($Z = 2.55$, $p = 0.011$ по сравнению с C57BL/6, $Z = 2.65$, $p = 0.011$, по сравнению с *Muc2^{+/+}*, *U*-критерий Манна-Уитни, Рисунок 6B).

Для того, чтобы охарактеризовать причину повышения проницаемости кишки у мышей с нокаутом гена *Muc2*, было проведено исследование ультраструктуры клеток толстой кишки мышей с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Существенной особенностью эпителиальных клеток кишки мутантных мышей было изменение морфологии плотных (ПК) и адгезивных контактов (АК). У контрольной линии C57BL/6 плотные контакты визуализировались как плотно соприкасающиеся участки мембраны, непосредственно под которыми располагалась электронно-плотная область, у мутантных мышей *Muc2^{-/-}* плотные контакты имели просвет и расширения (Рисунок 7 А). Адгезивные контакты у мутантных животных также имели дефекты (Рисунок 7 А, Б). Ширина обоих типов контактов достоверно была больше у мутантной линии по сравнению с контролем (ПК: $Z = 7.25$, $p < 0.001$, *U*-критерий Манна-Уитни; АК: $t = 6.27$, $p < 0.001$, *t*-критерий Стьюдента, Рисунок 8 А, Б). Количество межклеточных контактов с дефектами также было достоверно выше у мышей *Muc2^{-/-}* (ПК: $p < 0.001$, критерий χ^2 ; АК: $p < 0.001$, критерий χ^2 , Рисунок 8 А, Б). Кроме того, ПК в эпителии кишки мышей *Muc2^{-/-}* были достоверно длиннее, чем у контрольной линии ($Z = 3.62$, $p < 0.001$, *U*-критерий Манна-Уитни, Рисунок 3А).

Количество и морфология десмосом различались у мышей *Muc2^{-/-}* и C57BL/6 (Рисунок 7B). У мутантной линии количество десмосом на латеральной части мембраны эпителиальных клеток было выше ($t = 3.82$, $p < 0.001$, *t*-критерий Стьюдента, Рисунок 8 В), а также была увеличена доля десмосом со структурными дефектами ($p < 0.001$, критерий χ^2 , Рисунок 8 В). Ширина межклеточного пространства была больше у мутантных животных по сравнению с контрольной линией ($t = 7.72$, $p < 0.001$, *t*-критерий Стьюдента, Рисунок 8 В).

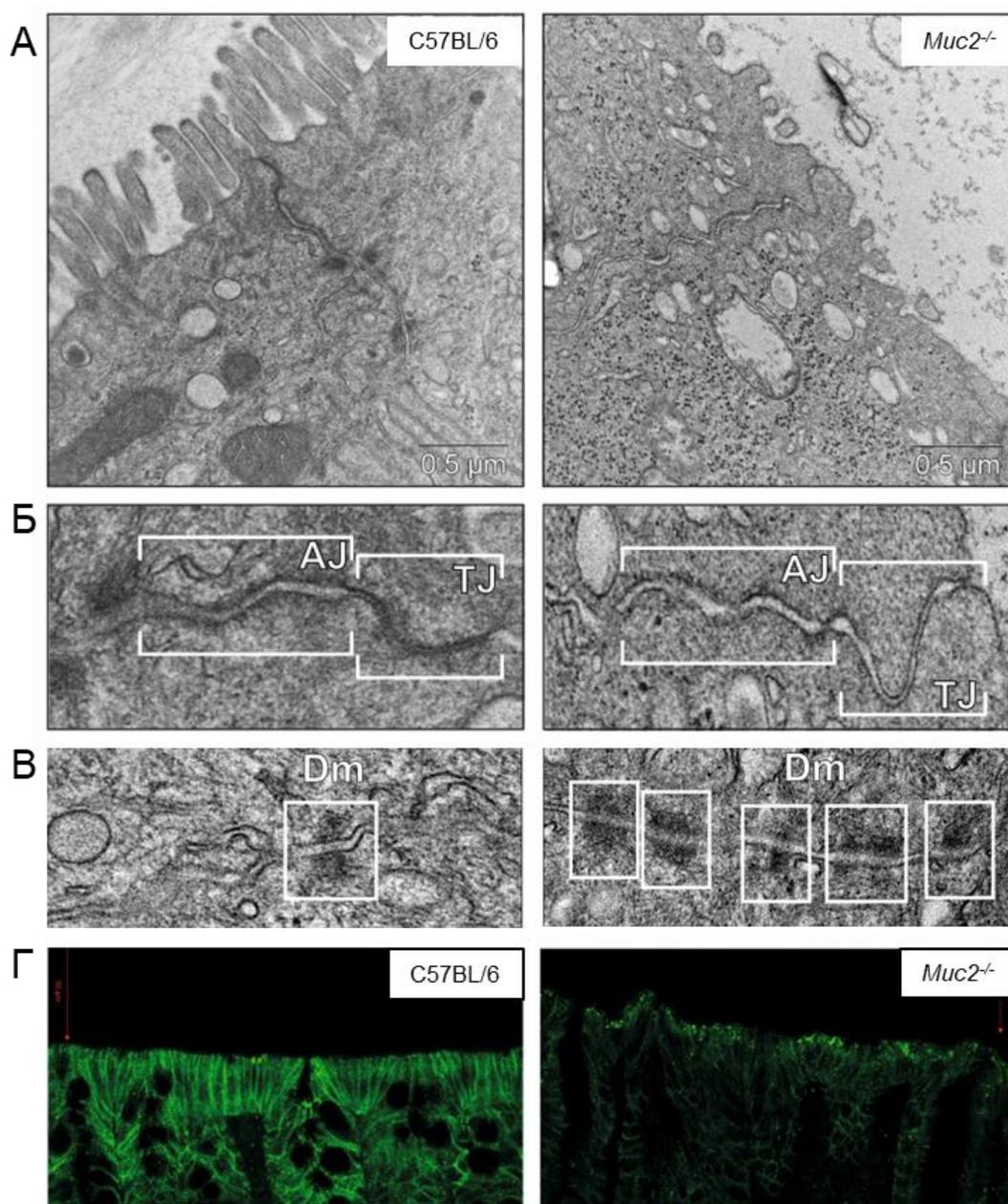


Рисунок 7. Повышение кишечной проницаемости у мышей *Muc2*^{-/-} обусловлено структурными нарушениями межклеточных контактов. А – В. ПЭМ образцов толстой кишки мышей C57BL/6 и *Muc2*^{-/-}. Отмечены плотные контакты (TJ), адгезивные контакты (AJ) и десмосомы (Dm). Г. Иммуногистохимическое окрашивание ткани нисходящей толстой кишки мышей линий C57BL/6 и *Muc2*^{-/-}. Зеленый флуоресцентный сигнал отражает присутствие и локализацию белка плотных контактов – клаудина-3.

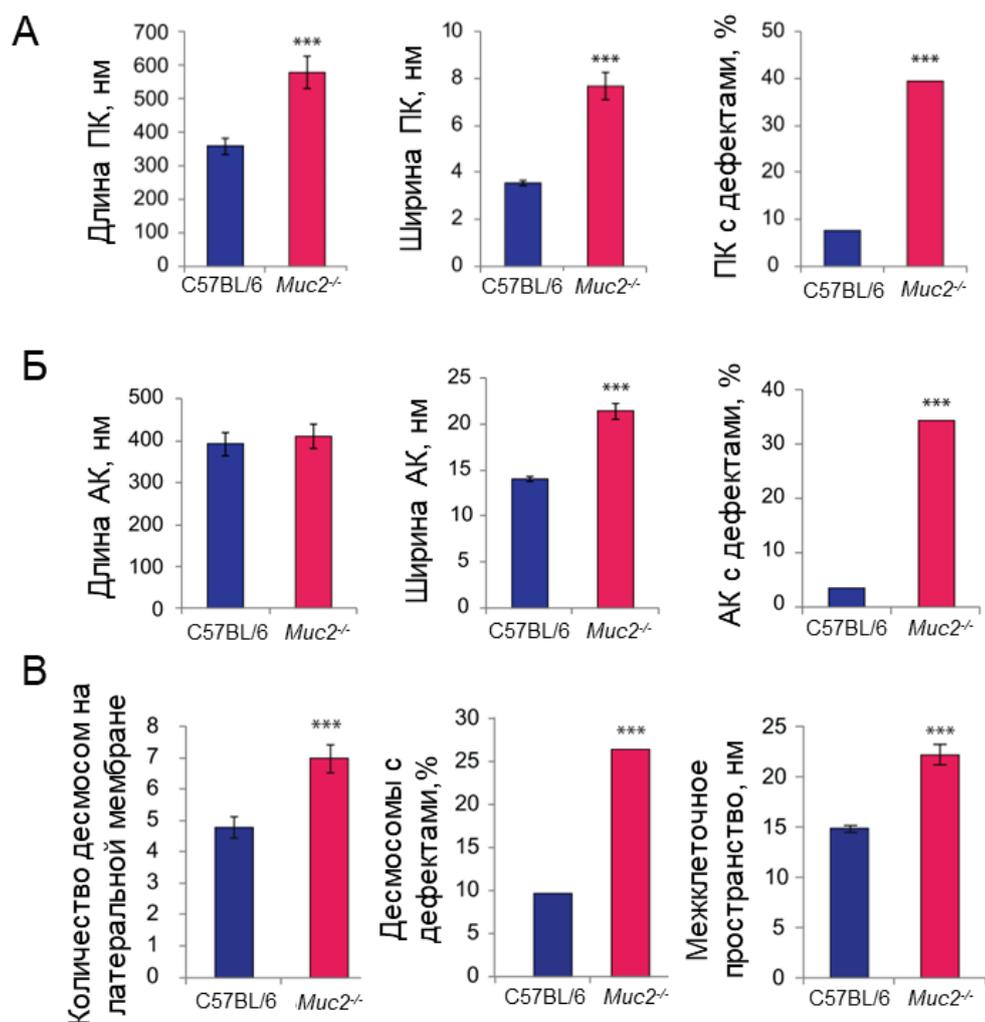


Рисунок 8. Параметры плотных контактов (ПК), адгезивных контактов (АК), и десмосом у мышей C57BL/6 и *Muc2*^{-/-}. А. Длина (***) $p < 0,001$, *U*-критерий Манна-Уитни), ширина (***) $p < 0,001$, *U*-критерий Манна-Уитни) и доля плотных контактов с дефектами (***) $p < 0,001$, критерий χ^2). **Б.** Длина, ширина (***) $p < 0,001$, *t*-критерий Стьюдента) и доля адгезивных контактов с дефектами (***) $p < 0,001$, критерий χ^2). **В.** Количество десмосом на латеральной части клеточной мембраны ($p < 0,001$, *t*-критерий Стьюдента), доля десмосом с дефектами ($p < 0,001$, критерий χ^2) и ширина межклеточного пространства ($p < 0,001$, *t*-критерий Стьюдента).

Для того, чтобы охарактеризовать локализацию в клетке белка плотных контактов клаудина-3 провели иммуногистохимическое окрашивание срезов ткани кишки мышей (Рисунок 7 Г). У мышей контрольной линии C57BL/6 кладин-3 можно было обнаружить, главным образом, на мембране клеток эпителия толстой кишки, тогда как у мутантных мышей *Muc2*^{-/-} большая часть кладина-3 локализовалась в цитоплазме. Предполагается, что делокализация белка ПК клаудина-3 с мембраны и его перераспределение в клетке, а также

структурные нарушения межклеточных контактов вносят существенный вклад в увеличение кишечной проницаемости у мышей линии *Muc2^{-/-}*.

Повышение проницаемости барьера между кровью и тканями органов у мышей линии *Muc2^{-/-}* было обнаружено не только в кишке, но и в головном мозге. Проницаемость ГЭБ для FITC-Dextran 4-kDa у мышей контрольной линии практически отсутствовала, тогда как у мышей *Muc2^{-/-}* наблюдалось повышение проницаемости ГЭБ для FITC-Dextran 4-kDa ($Z = -3,31$, $p < 0.001$, *U*-критерий Манна-Уитни, Рисунок 9).

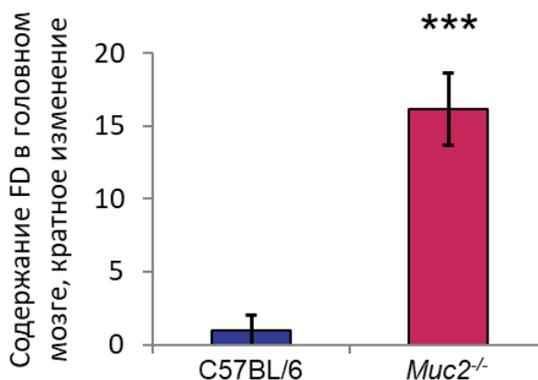


Рисунок 9. Оценка уровня проницаемости ГЭБ по содержанию FITC-Dextran 4 kDa в ткани головного мозга. * $p < 0.001$, *U*-критерий Манна-Уитни.**

3.1.3. Поведение мышей линии *Muc2^{-/-}* и однопометников *Muc2^{+/+}*

Результаты исследований морфологии толстой кишки мышей линии C57BL/6 подтверждают отсутствие воспаления у животных этой линии. В кишке мышей линии *Muc2^{-/-}*, в соответствии с опубликованными данными [12], [141], наблюдается хроническое воспаление, которое характеризуется гиперплазией эпителиальных клеток, инфильтрацией слизистой оболочки кишки ПМЯ-клетками и повышением кишечной проницаемости. В контексте полученных данных, важно проанализировать, как отсутствие наработки муцина-2 повлияет на работу оси «кишечник – мозг», и какие эффекты на поведение животных могут быть следствием хронического воспаления в кишечнике. На моделях ВЗК у лабораторных животных наблюдались изменения тревожного поведения, проявления депрессивноподобного поведения, уменьшение социальных взаимодействий [15], [152]. В первую очередь, было проведено поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом в гене муцина-2, чтобы оценить, оказывает ли у них хроническое воспаление физиологически-значимый эффект на функционирование головного мозга.

Поведение самцов мышей *Muc2^{-/-}* в домашней клетке было проанализировано с помощью установки Phenomaster, чтобы оценить поведение животных в знакомой [Введите текст]

обстановке без новых стимулов или стрессорных воздействий, которые обычно присутствуют в ходе проведения других поведенческих тестов. У мышей линии *Muc2^{-/-}* наблюдалось снижение двигательной активности (прохождение меньшей дистанции за день, $t = 2.46$, $p = 0.024$; t-критерий Стьюдента, Рисунок 10), а также увеличение потребления воды по сравнению с C57BL/6, что скорее всего было следствием диареи ($t = -3.59$, $p = 0.002$, t-критерий Стьюдента, Рисунок 10).

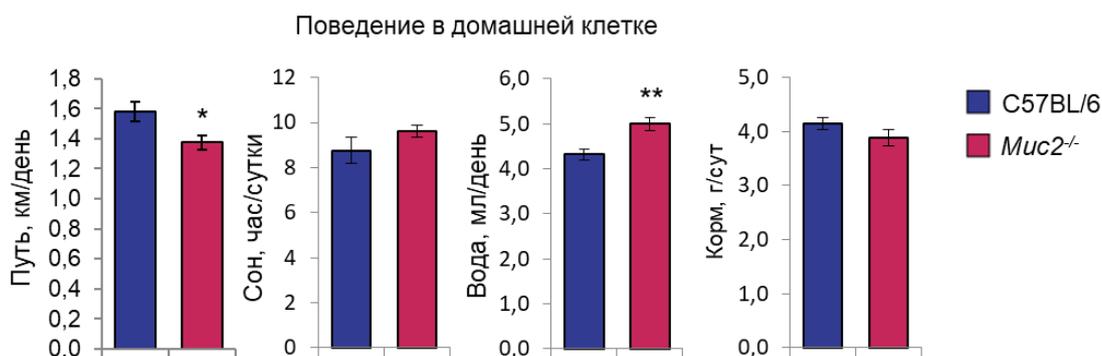


Рисунок 10. Поведение самцов мышей линии *Muc2^{-/-}* в домашней клетке. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, t-критерий Стьюдента.

В то же время, по результатам теста «открытое поле» снижения двигательной активности в новом окружении у самцов мышей линии *Muc2^{-/-}* по сравнению с C57BL/6 отмечено не было (путь: $t = -1.91$, $p = 0.06$, t-критерий Стьюдента; Рисунок 11А). Более того, мутантные животные значительно больше времени проводили в центре арены, чем самцы линии C57BL/6 ($Z = -3.333$, $p = 0.001286$, U-критерий Манна-Уитни, Рисунок 11Б), что свидетельствует о снижении тревожности [180], [181]. Количество вертикальных стоек было больше у мышей мутантной линии по сравнению с C57BL/6 ($t = -2.326$, $p = 0.026$, t-критерий Стьюдента, Рисунок 11В). Результаты теста «открытое поле» подтверждаются данными теста «Темно-светлая камера»: самцы мышей линии *Muc2^{-/-}* проходили большую дистанцию и демонстрировали больше выходов в светлую часть установки, чем самцы линии C57BL/6 (путь: $t = -3.067$, $p = 0.004$; количество выходов: $t = -3.66$, $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента, Рисунок 11 Г, Д). Для самцов мышей группы *Muc2^{+/+}* были проведены поведенческие тесты по тому же плану, что и в экспериментах с использованием мутантных животных. Особенности поведения мутантных самцов были обнаружены и у животных *Muc2^{+/+}*. В тесте открытого поля самцы мышей группы *Muc2^{+/+}* продемонстрировали повышение двигательной активности (путь: $t = -3.895$, $p < 0.001$, по сравнению с C57BL/6, $t = -2.94$, $p = 0.00885$, по сравнению с *Muc2^{-/-}*, t-критерий Стьюдента, Рисунок 11 А) и [Введите текст]

снижение тревожности (количество вертикальных стоек по сравнению с C57BL, $t = -4.97$, $p < 0.001$, t -критерий Стьюдента, время в центре по сравнению с C57BL, $Z = -2.98$, $p = 0.00286$, U -критерий Манна-Уитни, Рисунок 11 Б, В). В тесте "темно-светлая камера" самцы $Muc2^{+/+}$ были более активны в светлом отсеке, по сравнению с контрольной линией C57BL/6 (путь в светлом отсеке, $t = -4.019$, $p < 0.001$, количество выходов в светлый отсек, $t = -4.26$, $p < 0.001$, t -критерий Стьюдента, Рисунок 11 Г, Д). В тесте с закапыванием шариков самцы мышей линии $Muc2^{-/-}$ закапывали достоверно меньше шариков, чем самцы мышей контрольной линии, что говорит о снижении проявлений стереотипного поведения ($Z = 2.93$, $p = 0.006$; U -критерий Манна-Уитни, Рисунок 11Е). В тесте с закапыванием шариков самцы $Muc2^{+/+}$ закапывали меньше шариков по сравнению с C57BL/6 ($Z = 2.22$, $p = 0.026$; U -критерий Манна-Уитни, Рисунок 11Е).

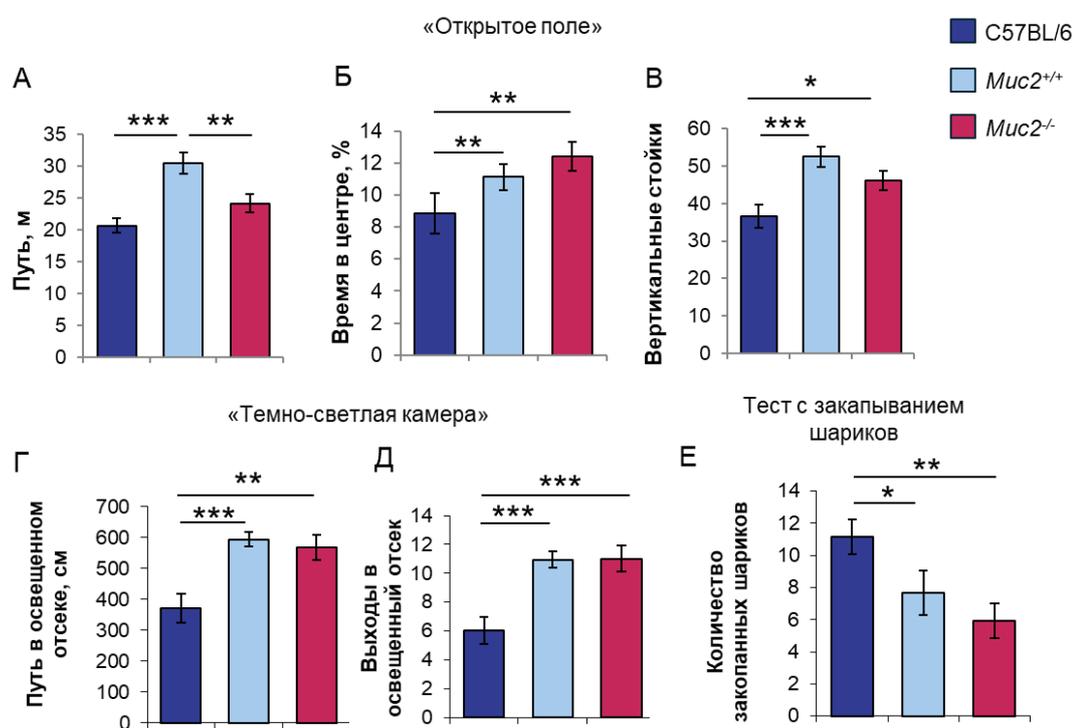


Рисунок 11. Особенности поведения самцов мышей $Muc2^{-/-}$ и самцов мышей $Muc2^{+/+}$. А. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, t -критерий Стьюдента; Б. ** = $p < 0.01$, U -критерий Манна-Уитни. В. * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$, t -критерий Стьюдента. Г, Д. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, t -критерий Стьюдента. Е. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, U -критерий Манна-Уитни.

3.1.4. Социальное поведение мышей линии *Misc2^{-/-}* и однопометников *Misc2^{+/+}*

Социальное поведение самцов мышей оценивали в ряде поведенческих тестов. В тесте с двумя интродерами самцы линии C57BL/6 демонстрировали предпочтение к взаимодействию с самкой-интродером: продолжительность контактов с самкой была больше, чем с самцом ($t = 4.08$, $p = 0,0022$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов, Рисунок 12 А). Мутантные самцы не демонстрировали избирательность по отношению к какому-либо интродеру, и взаимодействовали с самкой достоверно меньше, а с самцом достоверно больше, чем самцы контрольной линии C57BL/6 (продолжительность контакта с самкой либо самцом: $t = 3.61$, $p = 0,0022$, t-критерий Стьюдента для независимых образцов, Рисунок 12 А). Кроме того, в тесте с двумя интродерами около половины самцов в обеих группах демонстрировали атаки на самца-интродера (Рисунок 12 Б). Самцы мышей линии C57BL/6 чаще атаковали самца-интродера, чем делали садки на него и не атаковали самок (Рисунок 12 Б). Самцы мышей линии *Misc2^{-/-}* чаще делали садки на самца-интродера, чем самцы линии C57BL/6 ($p = 0.014$, тест χ^2 , Рисунок 12 Б), и атаковали самок ($p = 0.0048$, тест χ^2 , Рисунок 12 Б). Особенности социального поведения, характерные для *Misc2^{-/-}*, присутствовали и у *Misc2^{+/+}*. Самцы *Misc2^{+/+}* не демонстрировали выраженного предпочтения по отношению к самке-интродеру, больше взаимодействовали с самцом-интродером по сравнению с самцами C57BL/6 (продолжительность контактов самцов *Misc2^{+/+}* с самцом/самкой по сравнению с C57BL/6, $t = 3.67$, $p = 0,0022$, t-критерий Стьюдента для независимых образцов, Рисунок 12А), атаковали самок ($p < 0.001$, критерий χ^2 , Рисунок 12Б) и демонстрировали садки на самцов-интродеров ($p = 0.023$, критерий χ^2 , Рисунок 12Б).

Огромную роль в социальном поведении мышей играют запахи [182]. Для того, чтобы оценить влияние мутации в гене *Misc2* на восприятие социально-значимых запахов, проводили тест на выбор запаха. В качестве запаховых стимулов использовали загрязненный подстил из клеток самцов и самок. Самцы мышей всех исследованных групп проводили достоверно больше времени рядом с образцом запаха самок (C57BL/6: $t = 2.99$, $p = 0.0072$, *Misc2^{+/+}*: $t = 7.48$, $p = 0,000417$, *Misc2^{-/-}*: $t = 3.63$, $p = 0.0059$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов, Рисунок 12В).

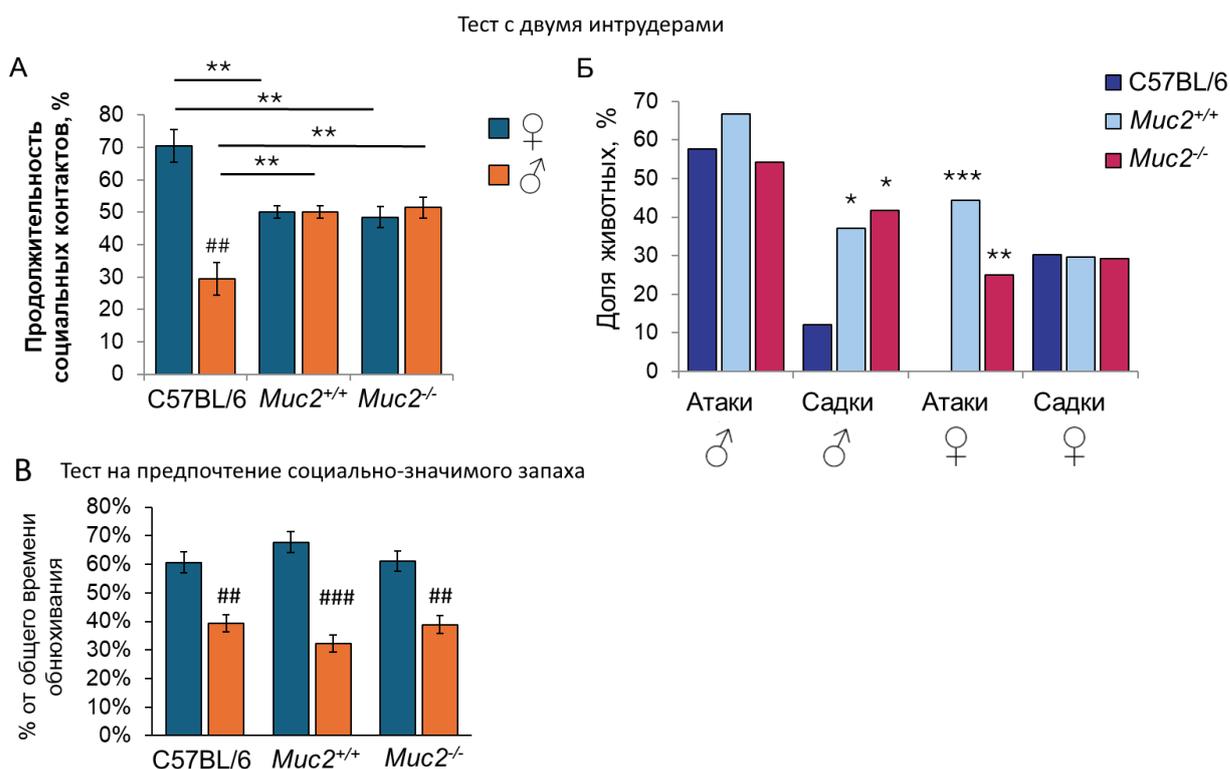


Рисунок 12. Особенности поведения самцов мышей $Muc2^{-/-}$ и $Muc2^{+/+}$ в тестах для оценки социального поведения. А. Тест с двумя интродерами. Продолжительность контактов с самцом либо с самкой для C57BL/6, ## = $p < 0.01$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов. Продолжительность контактов с интродером по сравнению с C57BL/6, ** = $p < 0.01$, t-критерий Стьюдента для независимых образцов. **Б.** Доля самцов, демонстрировавших атаки и садки на самок и самцов-интродеров в тесте с двумя интродерами. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, критерий χ^2 . **В.** Тест на предпочтение социально-значимого запаха. ## = $p < 0.01$, ### = $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов.

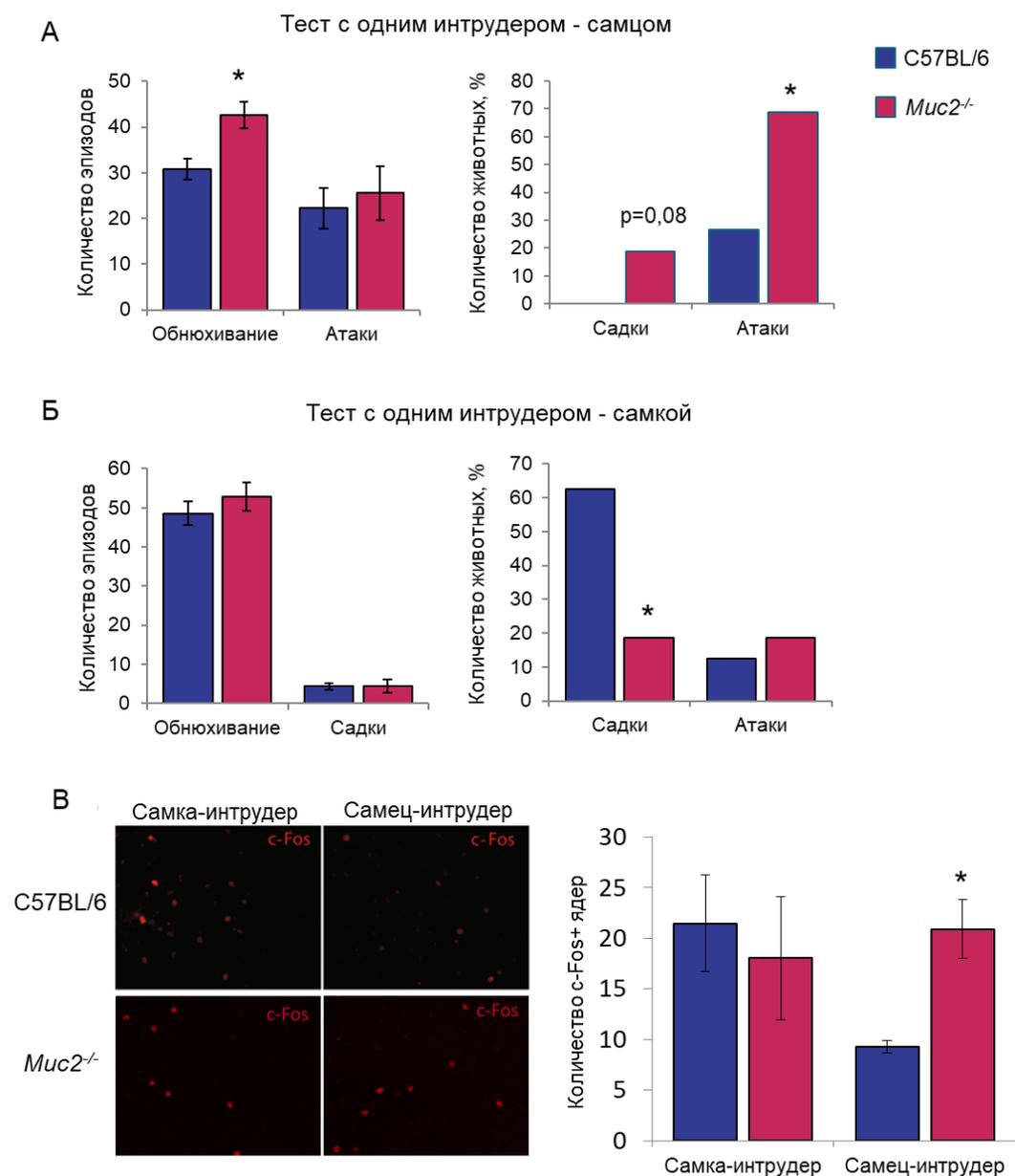


Рисунок 13. Поведенческие нарушения и анализ ИГХ окрашивания у самцов мышей линии *Muc2*^{-/-} в тесте с одним интродером. А. Тест с интродером – самцом. Количество обнюхиваний: * = $p < 0.05$, по сравнению с C57BL/6, t-критерий Стьюдента для независимых образцов. Доля демонстрировавших животных: * = $p < 0.05$, по сравнению с C57BL/6, критерий χ^2 . **Б.** Тест с интродером – самкой. * = $p < 0.05$, по сравнению с C57BL/6, критерий χ^2 . **В.** Пример окрашивания ВМГ на белок c-Fos и количество c-Fos-положительных ядер клеток после взаимодействия с интродерами, * $p < 0.05$ по сравнению с C57BL/6, U-критерий Манна-Уитни.

Социальное поведение самцов мышей было также оценено в тестах, в которых в домашнюю клетку к исследуемому самцу подсаживали одного интродера (самца или самку)

[Введите текст]

и отмечали количество обнюхиваний, атак и садок на интродера. В тесте с интродером-самцом количество обнюхиваний интродера было выше у самцов-резидентов *Muc2^{-/-}*, чем у C57BL/6 ($t = -2.32$, $p = 0,0274$, t -критерий Стьюдента для независимых образцов, Рисунок 13 А). Доля самцов, демонстрировавших атаки на самца-интродера, была достоверно больше среди мышей линии *Muc2^{-/-}*, чем среди самцов мышей линии C57BL/6 ($p = 0.0382$, критерий χ^2 , Рисунок 13 А). Самцы мышей линии *Muc2^{-/-}* чаще (на уровне тенденции) демонстрировали садки на самца-интродера, чем C57BL/6 ($p = 0.08$, критерий χ^2 , Рисунок 13 А). В то же время, если в качестве интродера предоставляли самку, мутантные самцы демонстрировали садки на самок реже, чем контрольные самцы линии C57BL/6 ($p = 0,0118$, критерий χ^2 , Рисунок 13Б).

Агрессивное и половое поведение у мышей регулируется нейронами различных структур головного мозга, в частности ядер гипоталамуса [169]. Активация нейронов в вентромедиальном ядре гипоталамуса (ВМГ) после взаимодействия с самцом-интродером либо самкой-интродером отражает выраженность предпочтения интродера конкретного пола. Оценку проводили по количеству *c-Fos*-позитивных ядер в ВМГ после проведения иммуногистохимического флуоресцентного окрашивания срезов головного мозга (Рисунок 13В). Количество *c-Fos*-позитивных ядер клеток в ВМГ у мутантных самцов после взаимодействия с самцом-интродером было достоверно больше, чем у самцов линии C57BL/6 ($Z = 2.33$, $p = 0.040$, U -критерий Манна-Уитни, рис 8В). Контрольные животные более выраженно реагировали на присутствие самки, чем взаимодействовали с самцом (на уровне тенденции, $p=0.11$, U -критерий Манна-Уитни), чего не наблюдается у мышей линии *Muc2^{-/-}* (Рисунок 13В).

3.1.5. Особенности поведения однопометников мышей *Muc2^{-/-}* без мутации (*Muc2^{+/+}*) и самцов мышей C57BL/6 после совместного содержания

Полученные результаты поведенческих тестов с использованием самцов мышей *Muc2^{+/+}* позволяют предположить, что их поведенческие особенности обусловлены именно кишечной микробиотой. В таком случае, совместное содержание самцов *Muc2^{+/+}* и C57BL/6 может минимизировать различия в поведении самцов мышей этих двух групп. Совместное содержание самцов мышей *Muc2^{+/+}* и C57BL/6 не привело к появлению значительных различий в результатах поведенческих тестов «Открытое поле», «Темно-светлая камера», тесте с закапыванием шариков и тесте с двумя интродерами при сравнении этих двух групп животных (Рисунок 14 А, Б, В, Г), кроме снижения количества выходов в освещенный отсек

[Введите текст]

в группе самцов мышей *Muc2^{+/+}* по сравнению с C57BL/6 ($t = 2.7$, $p = 0.015$, t-критерий Стьюдента для независимых образцов, Рисунок 14Б). Самцы мышей обеих исследованных групп больше контактировали с самкой-интродером, чем с самцом-интродером в тесте с двумя интродерами (продолжительность контактов самцов C57BL/6 с самцом/самкой $t = -7.08$, $p = 0.00012$, продолжительность контактов самцов *Muc2^{+/+}* с самцом/самкой, $t = -2.64$, $p = 0.027$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов, Рисунок 14 Г). Таким образом, наблюдаемые особенности поведения самцов мышей групп *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}* обусловлены скорее изменениями в составе кишечной микробиоты, чем хроническим кишечным воспалением.

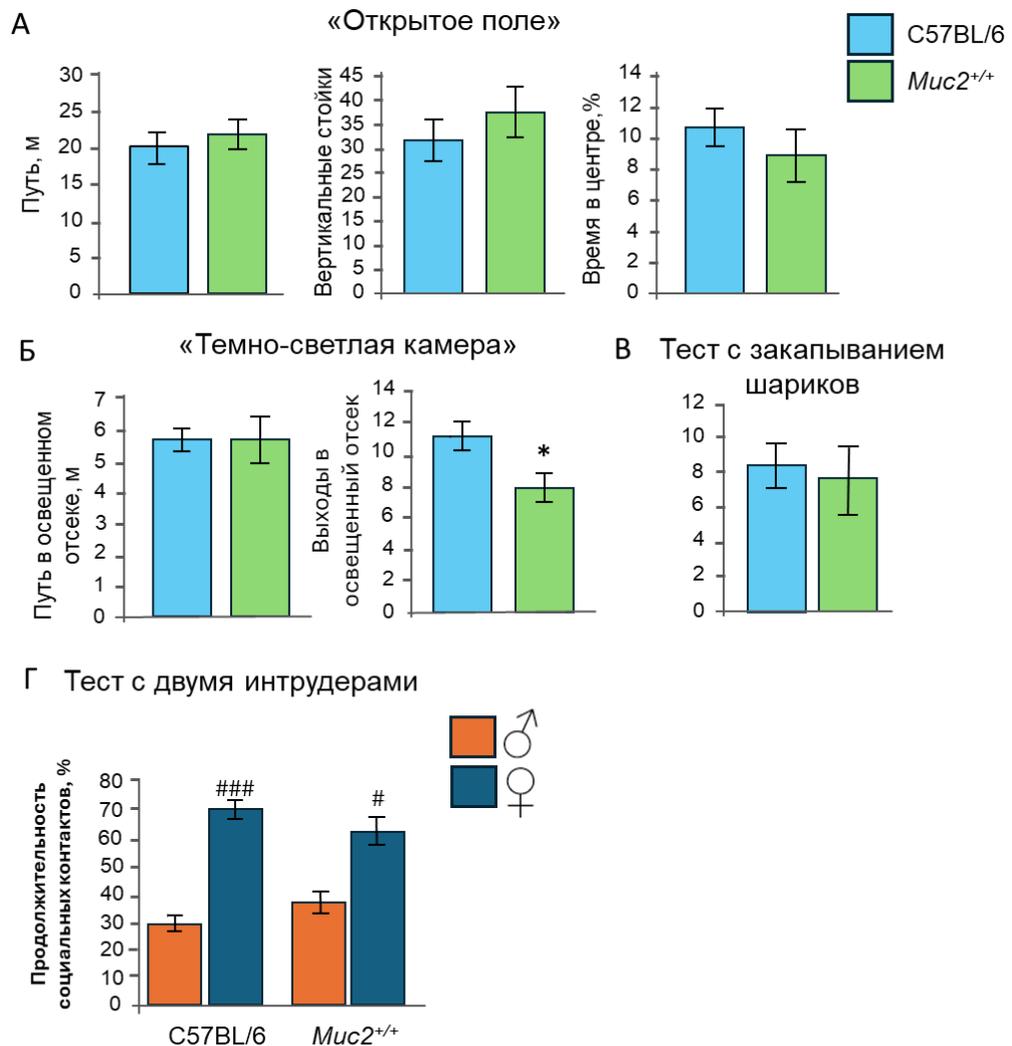


Рисунок 14. Особенности поведения самцов мышей *Muc2^{+/+}* и C57BL/6 после совместного содержания. А. Тест «Открытое поле». Б. Тест «Темно-светлая камера». * = $p < 0.05$, t-критерий Стьюдента. В. Тест с закапыванием шариков. Г. Тест с двумя интродерами. # = $p < 0.05$, ### = $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов.

3.1.6. Роль микробиоты в поведении мышей *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}*

Для того, чтобы охарактеризовать кишечную микробиоту у мутантных мышей *Muc2^{-/-}* и их одноплетников *Muc2^{+/+}*, было проведено секвенирование гипервариабельного района V3-V4 гена 16S рРНК. Относительная представленность 10 самых многочисленных родов бактерий показана на Рисунке 10 А. Было отмечено снижение доли *Blautia* и *Escherichia-Schigella*, а также повышение количества *Akkermansia* у мышей *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}* по сравнению с C57BL/6 (Рисунок 15 А). Достоверное повышение *Akkermansia muciniphila* было подтверждено с помощью ПЦР в реальном времени (*Muc2^{-/-}* по сравнению с C57BL/6: Z = -2,80, p = 0.0062, *Muc2^{+/+}* по сравнению с C57BL/6: Z = -2,74, p = 0.0062, U-критерий Манна-Уитни, Рисунок 15 Б).

По итогам проведенных поведенческих тестов на самцах мышей групп C57BL/6, *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}* были обнаружены следующие результаты. У мутантных животных *Muc2^{-/-}* отмечали увеличение исследовательской активности в новом окружении, снижение тревожности и отсутствие избирательности при взаимодействии с разнополыми интродуцерами. Выявленные поведенческие особенности не характерны для хронического кишечного воспаления, поэтому можно предположить, что наблюдаемый фенотип обусловлен колит-ассоциированной микробиотой, а не воспалением. У животных группы *Muc2^{+/+}* отсутствовало воспаление в кишечнике, однако, наблюдались поведенческие изменения, подобные таковым у животных группы *Muc2^{-/-}*. Данные исследования показывают, что особенности поведения самцов групп *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}*, по крайней мере отчасти, обусловлены изменениями в кишечной микробиоте, а не воспалением. Одним из элементов, связывающих работу кишечника и мозга у мышей с нокаутом гена, кодирующего муцин-2, могут быть изменения метаболизма, вызванные кишечной микробиотой. Важно отметить, что ранее уже было показано вовлечение системного метаболизма в реализацию передачи сигнала в оси «кишечник-мозг» [28], [54], [183], [184], [185]. Для проверки этой гипотезы метаболом крови и головного мозга у мышей групп C57BL/6, *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}* был исследован методом ЯМР-спектроскопии.

Предположительно, в регуляции поведения, ассоциированного с нокаутом в гене, кодирующем муцин-2, участвуют метаболиты, которые единообразно изменялись у мышей групп *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}* по сравнению с C57BL/6. Было обнаружено несколько таких веществ. К таким метаболитам крови можно отнести холин, бетаин, кетолейцин, 2-гидрокси-изовалериат, лейцин, фенилаланин, глюкозу и карнитин (Рисунок 15В) [186]. Для

[Введите текст]

ткани мозга методом ЯМР было определено 50 метаболитов. С помощью критерия Краскела-Уоллиса были определены метаболиты, для которых был достоверным фактор группы (мио-инозитол: $p = 0,028$, сцилло-инозитол: $p = 0,0221$, глицин: $p = 0,0154$, инозинат: $p = 0,0122$). Среди обнаруженных различий глицин представляет наибольший интерес, поскольку является нейротрансмиттером в ЦНС [187] и участвует в регуляции тревожного поведения [188], [189]. Показано увеличение содержания глицина для групп *Misc2^{-/-}* и *Misc2^{+/+}* по сравнению с C57BL/6 (C57BL/6 и *Misc2^{-/-}*: $Z = 2.562$, $p = 0,02$, C57BL/6 и *Misc2^{+/+}*: $Z = 2,008$, $p = 0,0446$, *U*-критерий Манна-Уитни, Рисунок 15Г).

Глицин в организме главным образом синтезируется из серина либо из холина, при этом бетаин выступает промежуточным продуктом [190]. Уровень серина был повышен в ткани мозга мышей *Misc2^{+/+}* на уровне тенденции ($p = 0,1$, *U*-критерий Манна-Уитни) [186]. В крови серин не удалось исследовать методом ЯМР. Уровни холина и бетаина в крови были выше у *Misc2^{-/-}* по сравнению с C57BL/6 (холин: $Z = -3,363$, $p = 0.0062$, бетаин: $Z = -2,986$, $p = 0.011$, *U*-критерий Манна-Уитни, Рисунок 10 В) и у *Misc2^{+/+}* по сравнению с C57BL/6 (холин: $Z = -3,742$, $p = 0.0029$, бетаин на уровне тенденции: $Z = -2,003$, $p = 0.055$, *U*-критерий Манна-Уитни, Рисунок 15 В). В ткани мозга различий по холину между группами не было, а бетаин не был обнаружен. Возможно, увеличение уровня глицина в мозге связано с уровнем бетаина и холина в крови и бактериальным метаболизмом. В целом, результаты ЯМР-спектроскопии крови и мозга мышей позволяют предположить, что глицин является потенциальным ключевым медиатором, регулирующим поведение самцов мышей на модели колита, ассоциированного с нокаутом в гене муцина-2.

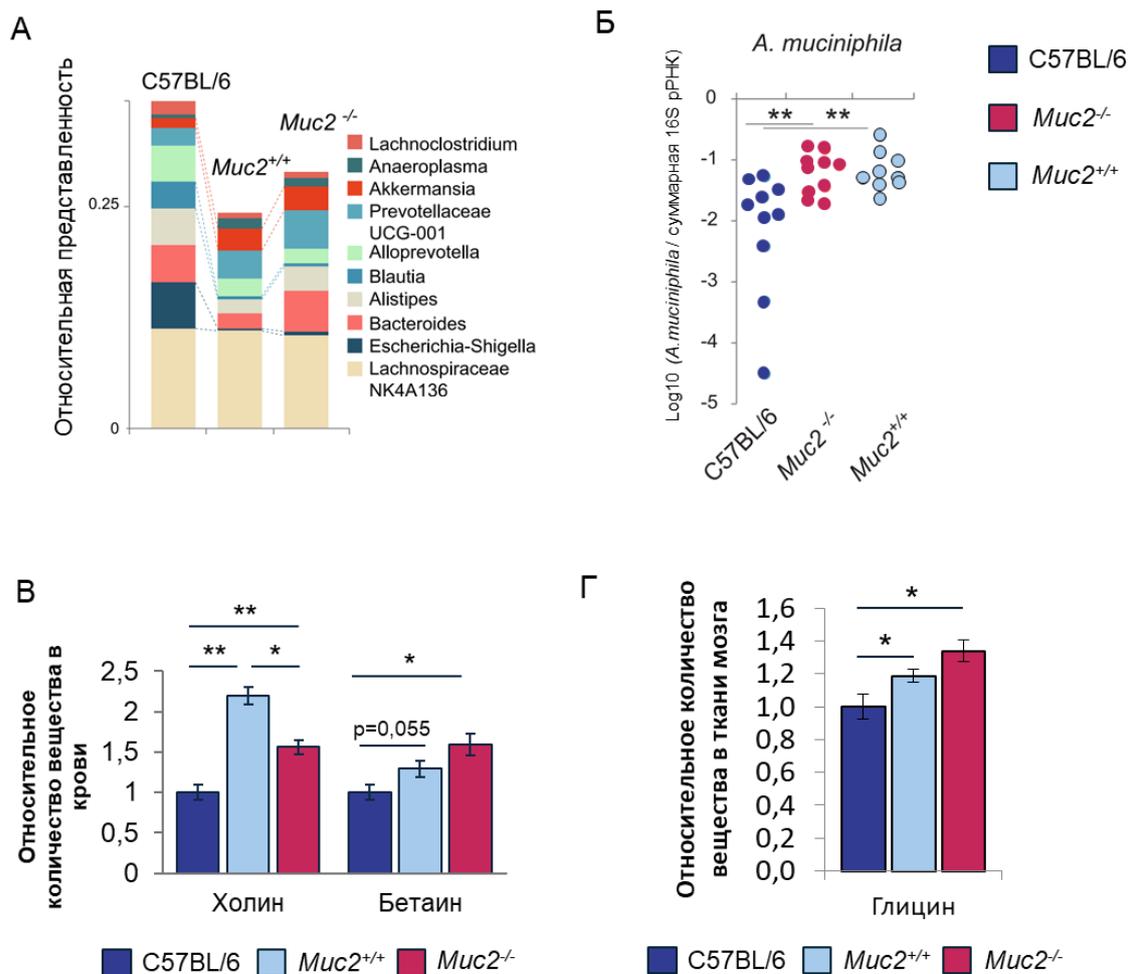
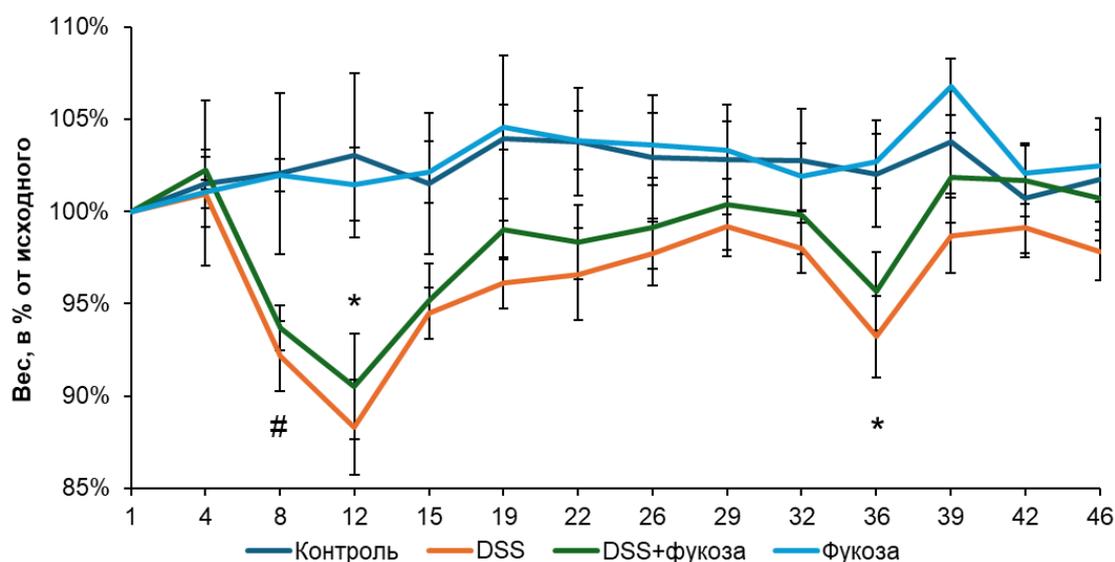


Рисунок 15. Метагеномный анализ содержимого кишечника и профиль метаболитов крови и головного мозга мышей *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{+/+}. А. Качественные изменения относительной представленности 10 самых многочисленных родов бактерий. Б. ПЦР в реальном времени. ** = $p < 0.01$, *U*-критерий Манна-Уитни. В. Относительное количество метаболитов крови по результатам анализа методом ЯМР-спектроскопии. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *U*-критерий Манна-Уитни. Г. Относительное количество глицина в головном мозге по результатам анализа методом ЯМР-спектроскопии. * = $p < 0.05$, *U*-критерий Манна-Уитни.

3.2. Особенности поведения самцов мышей с химически индуцированным воспалением кишечника

3.2.1. Выраженность хронического колита у мышей после химической индукции

В качестве второй модели нарушения кишечной стенки у мышей была использована хорошо описанная в литературе модель химически-индуцированного колита, вызванного поением животных раствором DSS [14]. В качестве дополнительного фактора, модулирующего состояние слизистой оболочки кишки, была выбрана фукоза – концевой моносахарид муцина – 2. После проведения полной схемы поения мышей, в первую очередь, было проверено, соответствует ли состояние животных хроническому колиту, и повлияло ли поение фукозой на выраженность воспаления в кишке. Предоставление DSS в хроническом эксперименте вызывало потерю веса тела (дисперсионный анализ повторных измерений, $F(1, 36) = 7,68$, $p = 0,0087$), также был отмечен достоверный эффект повторного измерения (дисперсионный анализ повторных измерений, $F(12, 432) = 6,98$, $p < 0.001$) и статистически достоверное взаимодействие факторов DSS и повторения (дисперсионный анализ повторных измерений, $F(12, 432) = 5,82$, $p < 0.001$). Статистически достоверного влияния фактора фукозы на вес тела животных в ходе эксперимента не было показано. В некоторые дни эксперимента животные, потреблявшие DSS, значительно теряли в весе, по сравнению с мышами, которые пили воду или фукозу, однако к концу схемы поения эти различия сгладились. Значительная потеря веса наблюдалась у животных в группе DSS + фукоза на 8 день ($t = 2.37$, $p = 0.029$, t-критерий Стьюдента), а также в группе DSS на 12 день ($t = 2.88$, $p = 0.029$, t-критерий Стьюдента) и на 36 день ($t = 2.42$, $p = 0.029$, t-критерий Стьюдента) по сравнению с контролем (Рисунок 16).



[Введите текст]

Рисунок 16. Вес тела животных в ходе эксперимента. * = $p < 0.05$, DSS по сравнению с Контролем, # = $p < 0.05$, DSS + Фукоза по сравнению с Контролем, t-критерий Стьюдента для независимых значений. DSS обозначает группу мышей с химически индуцированным колитом (предоставление DSS в питьевой воде).

Хроническое воздействие DSS на ткани толстой кишки привело к выраженному воспалению (Рисунок 17 А). Поение раствором DSS оказало статистически достоверное влияние на морфологию толстой кишки, оцененную по шкале: гиперплазия ($p = 0.0047$), инфильтрация ПМЯ клетками ($p < 0.001$), эрозия ($p = 0.0280$), и суммарная оценка ($p < 0.001$), критерий Краскела-Уоллеса. Поение фукозой не оказало статистически значимого эффекта на гистологическую оценку. Оценки морфологических изменений в кишке мышей, получавших DSS, были достоверно выше, чем у мышей контрольной группы; для DSS по сравнению с контролем: ПМЯк, $Z = -2.64$, $p = 0.01025$, суммарная оценка, $Z = -2.72$, $p = 0.01025$; U -критерий Манна-Уитни, для DSS + фукоза по сравнению с контролем: гиперплазия, $Z = -2,32$, $p = 0.020$, ПМЯк, $Z = -2.72$, $p = 0.01025$, суммарная оценка, $Z = -2.64$, $p = 0.01025$, U -критерий Манна-Уитни, Рисунок 17 Б.

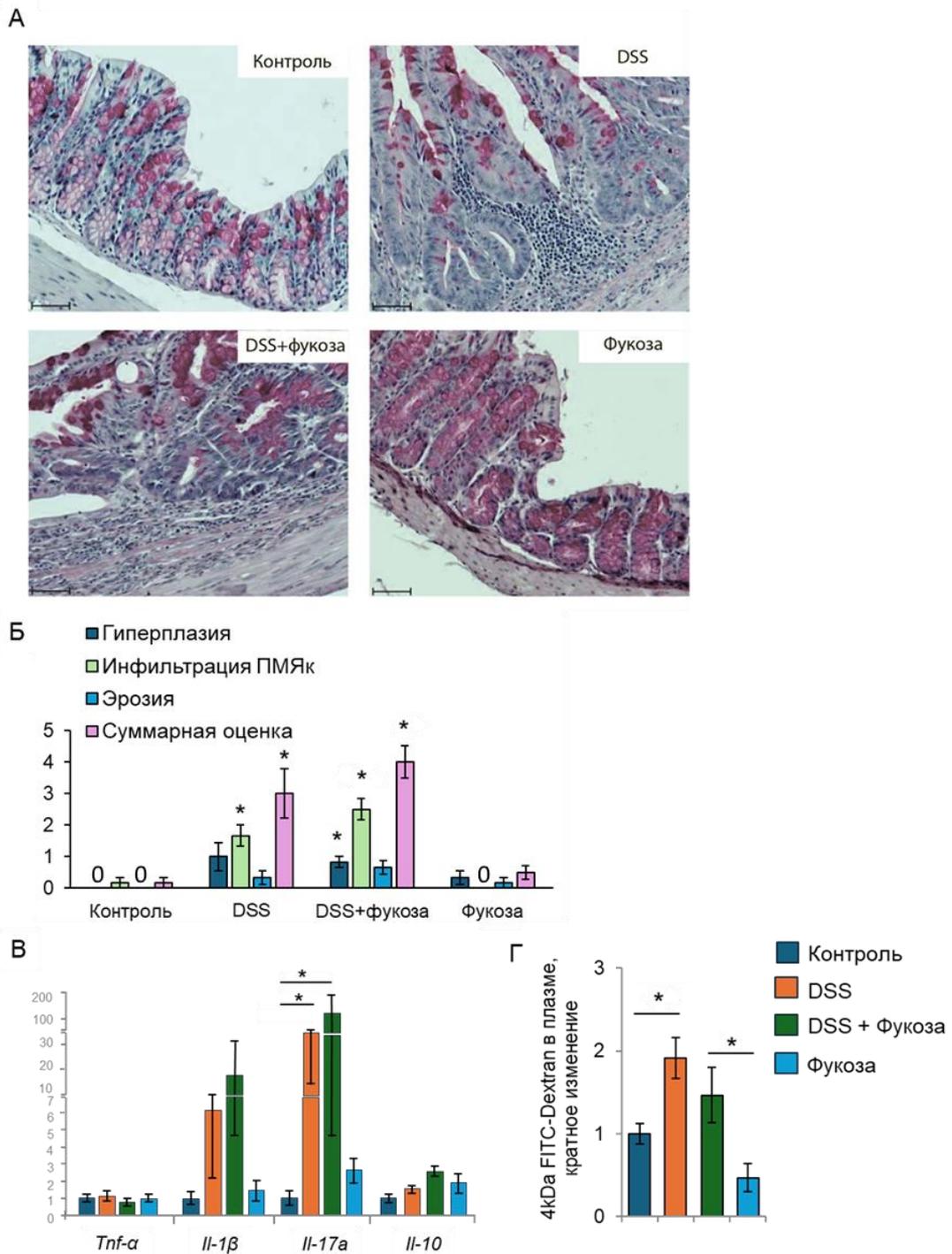


Рисунок 17. Развитие воспаления в толстой кишке при хроническом химически индуцированном колите. А. ШИК-окраска срезов толстой кишки мышей. Шкала 50 мкм. **Б.** Оценка морфологических изменений в толстой кишке мышей по гистологической шкале. * = $p < 0.05$, по сравнению с контролем, *U*-критерий Манна-Уитни. **В.** Экспрессия генов, нормализованная на уровень экспрессии β -тубулина (*Tubb5*). * = $p < 0.05$, *U*-критерий Манна-Уитни. **Г.** Содержание 4 kDa FITC-Dextran в плазме крови мышей после внутрижелудочного введения. * = $p < 0.05$, *U*-критерий Манна-Уитни. DSS обозначает

[Введите текст]

группу мышей с химически индуцированным колитом (предоставление DSS в питьевой воде).

Развитие хронического колита у животных было подтверждено с помощью измерения уровня экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов (Рисунок 17 В). Влияние фактора DSS было статистически достоверно только для гена провоспалительного цитокина IL17a ($p < 0.001$, критерий Краскела-Уоллеса). Влияние фактора фукозы на уровни экспрессии не было статистически значимо для исследованных генов. Повышение уровня экспрессии гена IL17a по сравнению с контролем было подтверждено с помощью U -критерий Манна-Уитни (DSS: $p = 0.014$; DSS + Fucose: $p = 0.014$, Рисунок 17 В). Некоторое повышение уровня $\text{IL-1}\beta$ относительно уровня контроля после потребления DSS не было статистически значимо. Низкие уровни экспрессии генов $\text{Tnf-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ и IL10 , а также повышение уровня экспрессии гена IL17a позволяют подтвердить развитие хронического колита у животных, получавших DSS в питье.

Оценку кишечной проницаемости в результате развития хронического воспалительного процесса проводили с помощью внутрижелудочного введения маркера проницаемости кишечного барьера (4 kDa FITC-Dextran) с последующей его детекцией в плазме крови мышей. Влияние фактора DSS на проницаемость кишки было статистически достоверно ($p = 0,001$, критерий Краскела-Уоллеса). Влияние фактора фукозы на проницаемость не было статистически значимо ($p = 0,057$, критерий Краскела-Уоллеса). Потребление DSS приводило к повышению проницаемости кишки (C57Bl/6 / DSS: $Z = 2.64$, $p = 0.0164$, DSS-фукоза/Фукоза: $Z = 2,00$, $p = 0.0453$, U -критерий Манна-Уитни, Рисунок 17 Г).

3.2.2. Социальное поведение мышей после химической индукции хронического колита совместно с предоставлением L-фукозы

Таким образом, полученная нами модель индуцированного кишечного воспаления на мышах линии C57Bl/6 является моделью именно хронического воспаления, при этом добавление моносахарида фукозы не оказывает влияния на выраженность воспаления. Согласно опубликованным данным, для модели DSS-индуцированного колита описаны изменения поведения мышей: появление тревожного поведения, снижение двигательной активности, уменьшение социальных взаимодействий [15], [16], [152]. В нашем исследовании поведение животных оценивали в последовательных тестах: открытое поле, тест на распознавание несоциального запаха, тест на выбор социально-значимого запаха и [Введите текст]

тест с двумя интродерами, при этом важно было оценить вклад факторов потребления животными DSS и фукозы отдельно либо совместно.

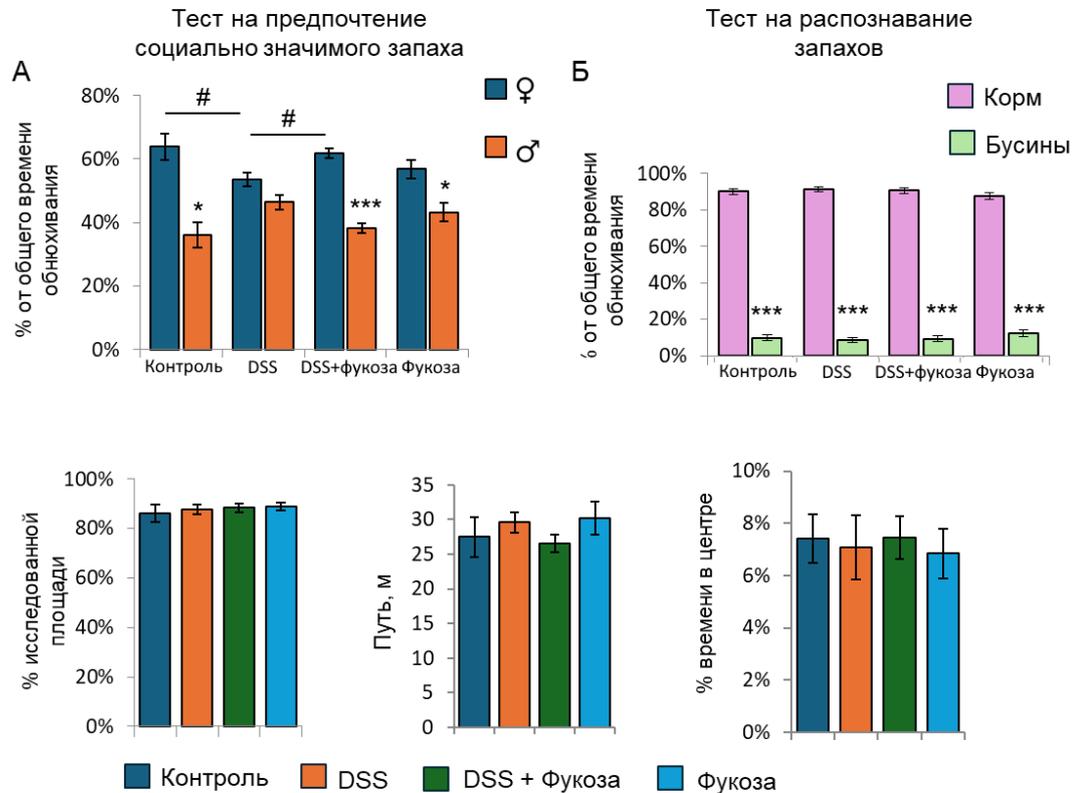


Рисунок 18. Хронический химически индуцированный колит приводит к изменению предпочтений запахов у самцов мышей. А. Доля времени обнюхивания образца запаха самок либо самцов от общего времени обнюхивания двух образцов. * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов, # = $p < 0.05$, t-критерий Стьюдента для независимых образцов. Б. Тест на распознавание запахов. Доля времени обнюхивания образца с кормом и образца с бусинами от общего времени обнюхивания двух образцов. *** = $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов. В. Исследовательская активность (доля исследованной площади арены), двигательная активность (пройденный путь) и тревожность (время, в течение которого животное находилось в центре арены) в тесте «Открытое поле». DSS обозначает группу мышей с химически индуцированным колитом (предоставление DSS в питьевой воде).

Поение DSS снижало предпочтение запаха самок, тогда как добавление фукозы к раствору DSS восстанавливало запаховые предпочтения. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное взаимодействие факторов DSS и фукозы ($F(1,53) = 7.1$, $p =$ [Введите текст])

0.010). Самцы группы DSS меньше обнюхивали образец запаха самок, чем самцы контрольной группы ($t = 2.22$, $p = 0.0426$, t-критерий Стьюдента, Рисунок 18 А). Добавление фукозы к раствору DSS привело к увеличению времени обнюхивания самцами группы DSS+фукоза образца подстила самок по сравнению с DSS ($t = 5.68$, $p = 0.01044$, t-критерий Стьюдента, Рисунок 18 А). Самцы мышей контрольной группы предпочитали запах самки запаху самца ($t = 3.41$, $p = 0.01044$, t-критерий Стьюдента, Рисунок 18 А). В группе с хроническим предоставлением DSS самцы не демонстрировали выраженного предпочтения запаха самки ($t = 1.61$, $p = 0.13$, t-критерий Стьюдента, Рисунок 18 А). Добавление 0.1% L-фукозы к 2% раствору DSS отменяло эффект DSS на запаховые предпочтения, таким образом, самцы группы «DSS+фукоза» предпочитали запах самок ($t = 8.00$, $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента, Рисунок 18 А). Самцы группы «Фукоза» предпочитали запах самок запаху самцов ($t = 2.37$, $p = 0.0426$, t-критерий Стьюдента, Рисунок 18 А).

В тесте на выбор объекта, запах которого представлял интерес для животного (корм), все исследованные животные проводили больше времени, обнюхивая сито с кормом внутри, чем контрольное сито без запаха (бусины) (Контроль: $t = 24.60$, $p < 0.001$, DSS: $t = 32.33$, $p < 0.001$, DSS+фукоза: $t = 23.05$, $p < 0.001$, Фукоза: $t = 18.83$, $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов, Рисунок 18 Б). Потребление DSS и фукозы по отдельности, либо совместно, не привело к изменению показателей теста «Открытое поле» по сравнению с контрольной группой (Рисунок 18 В). Доля площади арены, исследованная за время теста, пройденный путь и время, проведенное в центре, не различались у самцов мышей разных групп (Рисунок 18 В).

Социальное поведение самцов мышей оценивали в тесте с двумя интродерами. В домашнюю клетку к исследуемому самцу подсаживали интродеров самца и самку и отмечали продолжительность обнюхиваний (назо-назальных и аногенитальных), количество атак и садок на интродеров. Около половины самцов во всех группах демонстрировали атаки на самца-интродера (Рисунок 19 А). Также во всех группах некоторые самцы-резиденты демонстрировали садки на самца интродера, различий между группами при этом не наблюдалось (Рисунок 19 А). Только в группах «DSS» и «Фукоза» самцы атаковали самок («DSS» по сравнению с контролем: $p = 0.009$, «Фукоза» по сравнению с контролем: $p = 0.009$, тест χ^2 , Рисунок 19 А). Резиденты совершали садки на самок во всех группах, достоверных различий между группами не наблюдалось (Рисунок 19 А). Суммарное время контакта с обоими интродерами в ходе теста не различалось между группами (Рисунок 19 Б), проценты времени взаимодействия с интродером самкой либо

[Введите текст]

самцом также не различались (Рисунок 19 В). Во всех исследованных группах самцы проводили больше времени, контактируя с самкой, чем с самцом: Контроль: $t = 3,71$, $p = 0.00597$, DSS: $t = 4,66$, $p = 0.00217$, DSS + фукоза: $t = 4,79$, $p = 0.001988$, Фукоза: $t = 6,97$, $p = 0.000872$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов (Рисунок 19 В). В ходе взаимодействия с интродерами самцы-резиденты обнюхивали обоих интродеров. Показано достоверное влияние фактора DSS на продолжительность назальных обнюхиваний самки-интродера ($F(1, 32) = 5.37$, $p = 0.027$, двухфакторный дисперсионный анализ, Рисунок 19 Г). Статистически достоверных различий в продолжительности обнюхиваний между группами отмечено не было (Рисунок 19 Г).

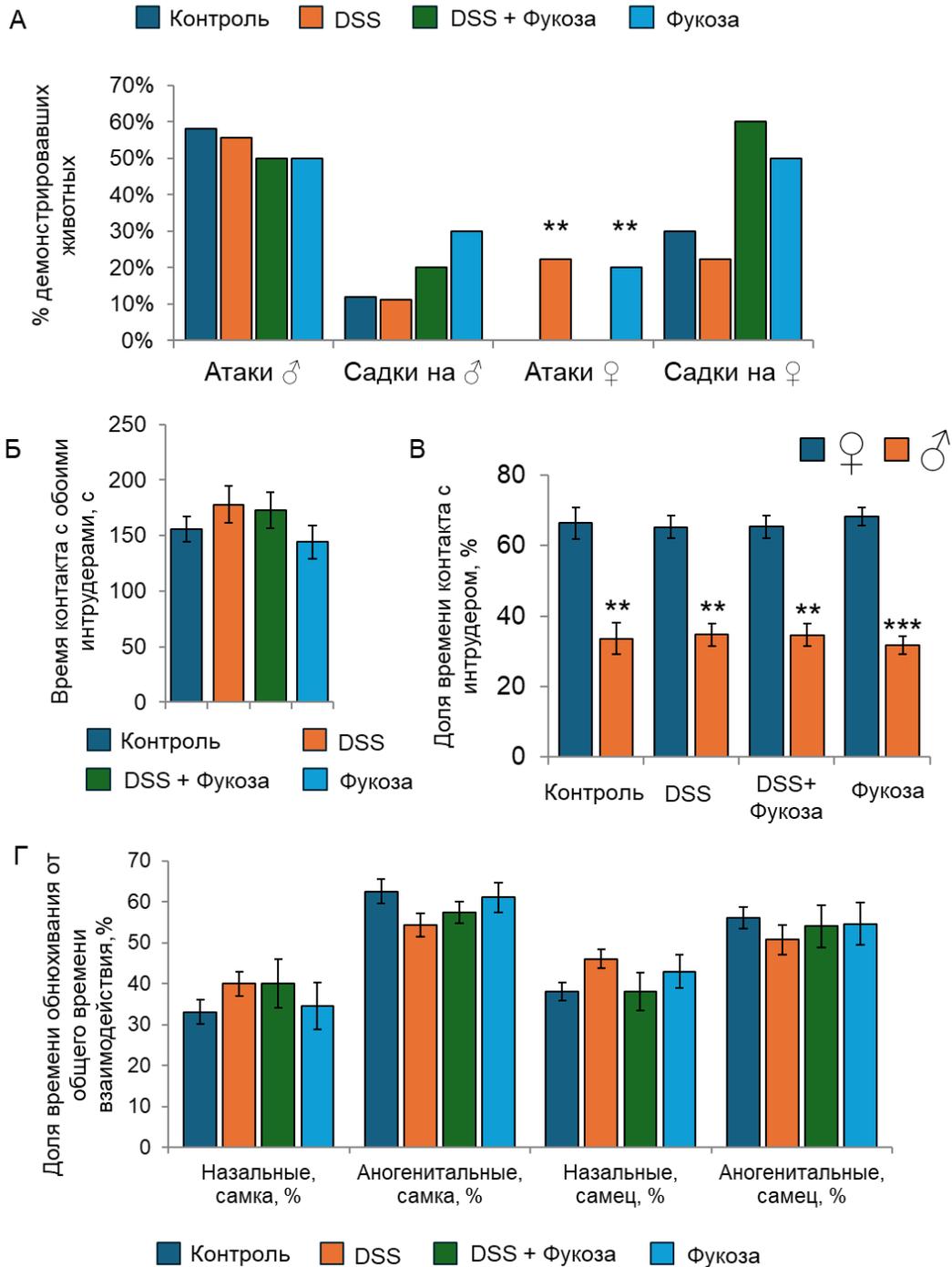


Рисунок 19. Показатели социального поведения в тесте с самцом и самкой в домашней клетке после химической индукции колита при добавлении фукозы. А. Доля животных, демонстрировавших атаки или садки на интродеров во время теста. ** = $p < 0,01$ по сравнению с контролем, тест χ^2 . **Б.** Время взаимодействия резидента с обоими интродерами. **В.** Доля времени контакта резидента с каждым из интродеров. ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, по сравнению со временем контакта с самкой, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов. **Г.** Доля времени назальных и аногенитальных обнюхиваний от [Введите текст]

времени взаимодействия резидента с интродером-самкой либо самцом. DSS обозначает группу мышей с химически индуцированным колитом (предоставление DSS в питьевой воде).

Далее с использованием метода ЯМР-спектроскопии была проведена оценка уровней содержания некоторых метаболитов в крови мышей. Суммарно был выявлен 51 метаболит. Чтобы оценить влияние DSS и фукозы на метаболический профиль, применяли двухфакторный дисперсионный анализ. Было выявлено статистически значимое влияние взаимодействия факторов DSS и фукозы на уровень в крови мышей следующих метаболитов: сукцинат ($F(1,26) = 5,27, p = 0.030$), триптофан ($F(1,26) = 6.84, p = 0.015$), миоинозитол ($F(1,26) = 5.23, p = 0.031$), аллантоин ($F(1,26) = 4.42, p = 0.045$), фумарат ($F(1,26) = 9.51, p = 0.005$) и аскорбат ($F(1,26) = 6.29, p = 0.019$). Для оценки эффекта поения мышей раствором DSS на уровни этих метаболитов между собой сравнивали группы Контроль и DSS с помощью теста Стьюдента. Было обнаружено достоверное снижение уровня сукцината ($t = 3.35, p = 0.011$), триптофана ($t = 3.88, p = 0.008$), миоинозитола ($t = 2.61, p = 0.023$) и фумарата ($t = 3.15, p = 0.011$) после поения мышей DSS. Для того, чтобы выявить, повлияло ли добавление фукозы к раствору DSS на уровни метаболитов в крови мышей, между собой сравнивали группы DSS и DSS+фукоза с помощью теста Стьюдента. Было обнаружено, что только уровень триптофана статистически достоверно изменился в группе DSS+фукоза по сравнению с группой DSS ($t = 2.24, p = 0.042$, t-критерий Стьюдента, Рисунок 20А).

Некоторые кишечные бактерии способны синтезировать триптофан [191]. Для того, чтобы выяснить, изменился ли уровень триптофан-продуцирующих бактерий при хроническом DSS-индуцированном колите, их содержание было оценено с помощью ПЦР в реальном времени. Было обнаружено достоверное снижение уровня триптофан-продуцирующих *E. coli* и *Bifidobacterium* в группе DSS по сравнению с контролем: *E. coli*, $p < 0.001$, *Bifidobacterium*, $p = 0.025$, критерий χ^2 , Рисунок 20Б. Однако уровень триптофан-продуцирующих *Bacteroides thetaiotaomicron* не изменился после поения DSS (Рисунок 20 Б). Добавление фукозы к раствору DSS привело к восстановлению уровня триптофан-продуцирующих *E. coli* ($p < 0.001$, критерий χ^2 , Рисунок 20 Б), однако не повлияло на уровень *Bifidobacterium*. Ранее было показано, что хронический DSS-индуцированный колит сопровождается увеличением уровня бактерий рода *Enterococcus* в фекалиях мышей [192]. В данном исследовании было обнаружено, что количество бактерий рода *Enterococcus* достоверно увеличилось в образцах группы DSS по сравнению с Контролем [Введите текст]

($p < 0.001$, критерий χ^2 , Рисунок 20 Б). Добавление фукозы к раствору DSS приводило к снижению количества *Enterococcus* до уровня ниже предела детекции в группе DSS+фукоза ($p = 0.007$ по сравнению с DSS, критерий χ^2 , Рисунок 20 Б).

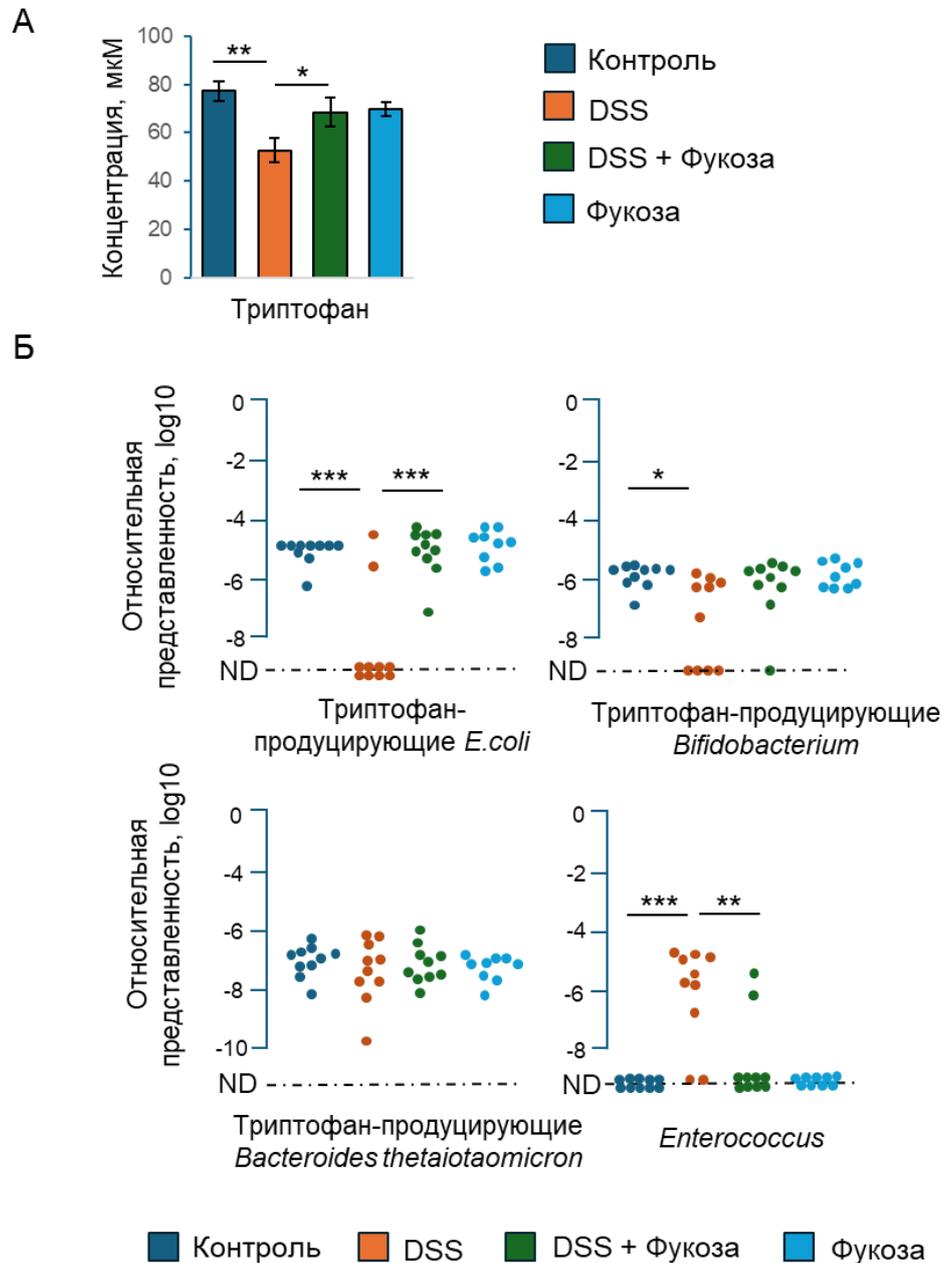


Рисунок 20. Добавление фукозы нормализует уровень триптофан-продуцирующих бактерий в кишечнике и триптофана в плазме крови. А. Концентрация триптофана в крови мышей. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, t-критерий Стьюдента для независимых образцов. **Б.** Количество бактерий в составе кишечной микробиоты, нормализованное на универсальный район гена 16S рРНК. ND – not detected. * = $p < 0.05$,

[Введите текст]

** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, критерий χ^2 . DSS обозначает группу мышей с химически индуцированным колитом (предоставление DSS в питьевой воде).

Для того, чтобы подтвердить, что вышеописанные поведенческие особенности регулируются при участии метаболита триптофана, требовалось проверить, влияет ли инъекция серотонинового прекурсора 5-гидрокситриптофана (5-НТП) на поведение самцов мышей в тесте на выбор социального запаха (группа DSS+5-НТП). Инъекция 5-НТП перед запаховым тестом приводила к восстановлению предпочтения запаха самок у самцов группы DSS+5-НТП ($t = 4.39$, $p = 0.004$, t-критерий Стьюдента, Рисунок 21 А). Время обнюхивания образца запаха самок самцами DSS+5-НТП было больше, чем у самцов группы DSS ($t = 2.96$, $p = 0.007$, t-критерий Стьюдента, Рисунок 21 А).

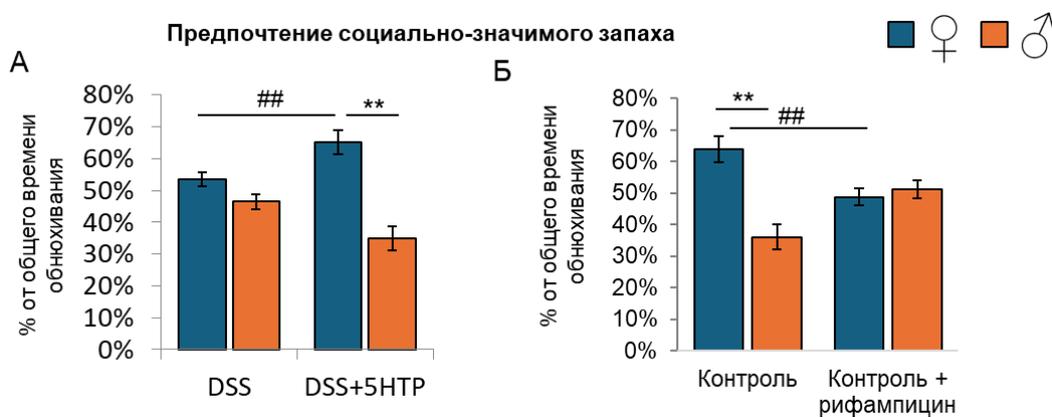


Рисунок 21. Влияние триптофан-продуцирующих бактерий кишечной микробиоты на запаховые предпочтения самцов мышей. А. Доля времени обнюхивания образца запаха самок либо самцов от общего времени обнюхивания двух образцов после инъекции 5-гидрокситриптофана (DSS + 5-НТП) либо фосфатного буфера (DSS). ** = $p < 0.01$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов, ## = $p < 0.01$, t-критерий Стьюдента для независимых образцов **Б.** Доля времени обнюхивания образца запаха самок либо самцов от общего времени обнюхивания после предоставления антибиотика либо без предоставления. ** = $p < 0.01$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов, ## = $p < 0.01$, t-критерий Стьюдента для независимых образцов. DSS обозначает группу мышей с химически индуцированным колитом (предоставление DSS в питьевой воде).

Для того, чтобы подтвердить эффект воздействия именно триптофан-продуцирующих бактерий на запаховые предпочтения самцов мышей, был использован антибиотик с целью существенного снижения количества этих бактерий в кишечной микробиоте самцов мышей линии C57BL/6. При использовании методов культивирования бактерий было показано, что [Введите текст]

именно эта *E. coli* чувствительна к антибиотику рифампицину. Предоставление самцам мышей рифампицина привело к снижению времени обнюхивания образца запаха самок по сравнению с контролем ($t = 3,05$, $p = 0.0075$, t -критерий Стьюдента, Рисунок 21 Б) и отсутствию предпочтения запаха самки ($t = -0,43$, $p = 0.67$, t -критерий Стьюдента, Рисунок 21 Б). Самцы мышей контрольной группы предпочитали запах самки запаху самца ($t = 3.41$, $p = 0.0075$, t -критерий Стьюдента). Результаты проведенных экспериментов позволяют заключить, что изменения в составе кишечной микробиоты являются ключевыми для реализации поведенческого паттерна, который наблюдается в тесте на выбор социально-значимого запаха у животных с хроническим DSS-индуцированным колитом.

3.2.3. Оценка выраженности воспаления после химической индукции острого колита на мышах

Эффекты фукозы при совместном предоставлении с DSS наблюдались и на модели индуцированного DSS острого кишечного воспаления на самцах мышей C57BL/6. Предоставление DSS в питье в остром эксперименте вызывало значительное воспаление в толстой кишке, при этом добавление моносахарида фукозы к потребляемому DSS не ослабляло выраженность воспаления (Рисунок 22 А). Поение раствором DSS в остром эксперименте оказало статистически достоверное влияние на морфологию толстой кишки, оцененную по гистологической шкале: гиперплазия ($p = 0,0014$), инфильтрация ПМЯ клетками ($p < 0.001$), эрозия ($p < 0.001$), и суммарная оценка ($p < 0.001$), критерий Краскела-Уоллеса. По результатам анализа с помощью теста U -критерий Манна-Уитни, оценки морфологических изменений в кишке мышей, получавших DSS в питье, были достоверно выше, чем у мышей контрольной группы (для группы DSS по сравнению с контролем: ПМЯк, $Z = -2,45$, $p = 0.023$, эрозия, $Z = -2,45$, $p = 0.023$, суммарная оценка, $Z = -2,45$, $p = 0.023$, U -критерий Манна-Уитни, для группы DSS+ фукоза по сравнению с контролем: гиперплазия, $Z = -2,45$, $p = 0.023$, ПМЯк, $Z = -2,45$, $p = 0.023$, эрозия, $Z = -2,45$, $p = 0.023$, суммарная оценка, $Z = -2,45$, $p = 0.023$, U -критерий Манна-Уитни, Рисунок 22 Б). Фукоза не смягчала выраженность воспаления в толстой кишке, оценка инфильтрация ПМЯ клетками для группы DSS+фукоза была выше, чем в группе DSS: $Z = 2,09$, $p = 0,047$, U -критерий Манна-Уитни, Рисунок 22 Б.

Для того, чтобы дополнительно оценить выраженность воспалительного ответа в толстой кишке мышей, был проведен анализ уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов $Tnf-\alpha$ и $Il-1\beta$. Был показан статистически значимый эффект DSS на уровень

экспрессии генов провоспалительных цитокинов (Tnf- α , $p < 0.001$, Il-1 β , $p < 0.001$, критерий Краскела-Уоллеса). Уровень Tnf- α и Il-1 β был повышен у мышей, потреблявших DSS, как отдельно, так и в сочетании с фукозой (группа DSS: TNF- α , $Z = -2,74$, $p = 0.012$, IL-1 β , $Z = -2.45$, $p = 0.014$, группа DSS + фукоза: TNF- α , $Z = -2.74$, $p = 0.012$, IL-1 β , $Z = -2.51$, $p = 0.014$, U -критерий Манна-Уитни, Рисунок 22 В). Предоставление фукозы в питье не вызывало воспалительных явлений в ткани толстой кишки и не приводило к статистически значимому повышению уровня цитокинов (Рисунок 22 А, Б, В).

3.2.4. Социальное поведение мышей после химической индукции острого колита

Было обнаружено статистически значимое влияние фактора DSS в эксперименте с острым воздействием на время обнюхивания образца запаха самок (двухфакторный дисперсионный анализ, $F(1,20) = 6,08$, $p = 0,023$). В то время, как самцы контрольной группы, достоверно предпочитали запах самок запаху самцов ($t = 11,59$, $p = 0,00042$, t -критерий Стьюдента для зависимых образцов, Рисунок 22 Г), самцы, потреблявшие раствор DSS, не демонстрировали выраженного предпочтения запаха самки в тесте на выбор социального запаха ($t = -0.97$, $p = 0.38$, t -критерий Стьюдента для зависимых образцов, Рисунок 22 Г). Самцы группы DSS достоверно меньше времени обнюхивали образец запаха самки, чем самцы контрольной группы ($t = 5.60$, $p = 0.00213$, t -критерий Стьюдента для независимых образцов, Рисунок 22 Г). Предоставление фукозы в сочетании с DSS сглаживало эффект потребления DSS на предпочтение запаха самки на уровне тенденции. Самцы группы DSS+фукоза предпочитали запах самок, но статистической достоверности в этом случае не было ($t = 1,82$, $p = 0,16$, t -критерий Стьюдента для зависимых образцов, Рисунок 22 Г). Самцы, потреблявшие только фукозу, предпочитали запах самок ($t = 3,05$, $p = 0.048$, Рисунок 22 Г). Таким образом, влияние фукозы на выбор социально значимого запаха самцами было показано и на модели острого предоставления DSS, хотя и наблюдаемые эффекты фукозы на поведение были выражены слабее, чем на модели хронического потребления DSS.

Таким образом, хроническое потребление DSS приводит к снижению уровня триптофан-продуцирующих бактерий, снижает уровень триптофана в крови и предпочтение самцами запаха самок в ольфакторном тесте. Добавление фукозы к раствору DSS не влияет на выраженность кишечного воспаления, однако восстанавливает уровень триптофан-продуцирующих бактерий, повышает содержание триптофана в крови и восстанавливает предпочтение запаха самок самцами (группа «DSS+фукоза»). Наши

[Введите текст]

данные позволяют предположить, что именно изменения кишечной микробиоты являются причиной изменения поведения самцов мышей при DSS-индуцированном колите.

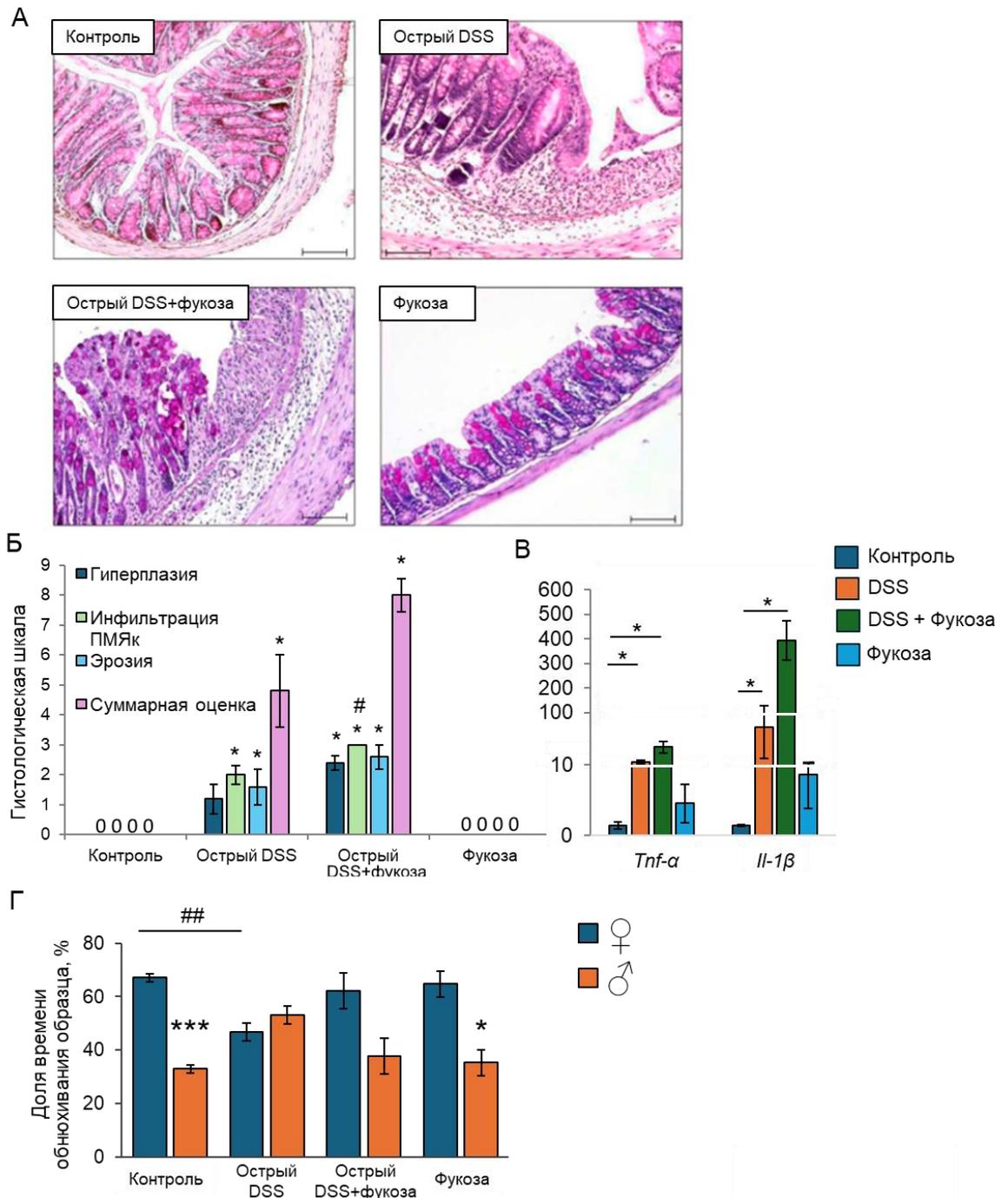


Рисунок 22. Влияние фукозы на воспаление и предпочтение социальных запахов при остром химически индуцированном колите. А. ШИК-окраска срезов толстой кишки мышей. Шкала 100 мкм. **Б.** Оценка морфологических изменений по гистологической шкале. * = $p < 0.05$ по сравнению с Контролем, # = $p < 0.05$ по сравнению с «Острый DSS», *U*-критерий Манна-Уитни. **В.** Экспрессия генов цитокинов в толстой кишке мышей,

[Введите текст]

нормализовано на экспрессию гена β -тубулина (*Tubb5*). * = $p < 0.05$, *U*-критерий Манна-Уитни. Г. Время обнюхивания образца запаха самки либо самца в ходе теста на выбор социально значимого запаха. * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$, *t*-критерий Стьюдента для зависимых образцов, ## = $p < 0.01$, *t*-критерий Стьюдента для независимых образцов. DSS обозначает группу мышей с химически индуцированным колитом (предоставление DSS в питьевой воде).

3.3. Взаимное соответствие реакций на самца и самку в контактном и запаховом тестах

В данной работе были охарактеризованы две модели хронического колита на мышах и описаны нарушения кишечной микробиоты, которые, по всей видимости, являются причиной изменения агрессивного и полового поведения самцов. Для самцов мышей с хроническим воспалением кишечника, генетически обусловленным дефицитом белка муцина-2, было показано изменение поведения в тесте с двумя интродерами, тогда как у самцов мышей с кишечным воспалением, химически индуцированным декстрансульфатом натрия, было изменено именно предпочтение социально-значимых запахов. Несмотря на то, что в обоих случаях нарушения наблюдаются именно в социальном поведении, было продемонстрировано участие разных нейромедиаторов в реализации этих типов поведения на двух исследованных моделях ВЗК. Для того, чтобы более подробно охарактеризовать взаимодействие животных в тесте с двумя интродерами и описать предполагаемый механизм нарушений полового и агрессивного поведения, было проведено несколько экспериментов с использованием самцов мышей линии C57BL/6.

Социальные взаимодействия самцов C57BL/6 были оценены в тесте с двумя интродерами с помощью измерения времени взаимодействия с самцом и самкой-интродерами в секундах и в процентах от общего времени взаимодействия. Также было подсчитано количество атак, садок и суммарное количество контактов с самцом и самкой-интродерами. Данные с четырех независимых экспериментов (группы № 1 - 4, $n = 40$) объединили, они представлены на рисунке 18 А – Г. Количество контактов с интродерами оценивали в двух независимых экспериментах (на рисунке 18 Д показан объединенный результат этих экспериментов, $n = 20$). В наших экспериментах самец-резидент предпочитал взаимодействовать с самкой-интродером. Самцы-резиденты проводили больше времени, взаимодействуя с самкой-интродером и в абсолютных значениях ($t = -11.5$, $p < 0.001$, *t*-критерий Стьюдента для зависимых образцов, Рисунок 23А) и в долях от

[Введите текст]

общего времени взаимодействия ($t = 12.18$, $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов, Рис, 18 Б). Агрессию оценивали как количество атак (драки и укусы) по отношению к самцу либо самке-интродеру. Самцы-резиденты были более агрессивными по отношению к самцу-интродеру ($p < 0.05$, точный тест Фишера, Рисунок 23 В). Половое поведение оценивали как количество садок, самцы-резиденты предпочитали делать садки на самок, садки на самцов они демонстрировали редко ($p < 0.001$, точный тест Фишера, Рисунок 23 Г). Количество контактов с каждым из интродеров также подтверждает преобладающий интерес самцов-резидентов к самкам-интродерам ($t = 5.33$, $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов, Рисунок 23 Д). Далее элементы социального поведения были исследованы в тесте с двумя интродерами ($n = 11$). Преобладающими элементами социального поведения в ходе теста были назо-назальные и аногенитальные обнюхивания, в меньшей степени преследования и груминг интродеров. Значительное предпочтение самцами-резидентами самок было показано только для аногенитальных обнюхиваний ($Z = 2.93$, $p < 0.01$, критерий Уилкоксона, Рисунок 23Е). Анализ элементов поведения с помощью метода главных компонент показал, что паттерны социального поведения по отношению к самцу и самке значимо отличаются по компоненте №1 ($t = -27.99$, $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента для независимых образцов, Рисунок 23 Ж), при этом основной вклад в наблюдаемые различия вносили аногенитальные обнюхивания (Рисунок 23 З). Задачей данного эксперимента было определить, может ли тест на выбор социально-значимого запаха полноценно заменить тест с двумя интродерами для оценки предпочтения самки самцом. Сравнение результатов этих двух тестов с использованием одних и тех же животных (группы №1 - 3, $n = 30$) позволило обнаружить, что предпочтение интродера-самки в тесте с двумя интродерами не коррелирует с предпочтением запаха самок в тесте на выбор социально-значимого запаха ($r = 0.12$, $p = 0.47$, коэффициент корреляции Спирмена, Рисунок 23 И). Несмотря на то, что основной вклад во взаимодействие самца-резидента с самкой в тесте с двумя интродерами вносят обнюхивания аногенитальной области самки, использования образца загрязненного подстила из клетки самок недостаточно, чтобы воспроизвести эффект предпочтения самки и реализовать поведение самца, аналогичное его поведению в тесте с двумя интродерами. Предполагается, что нарушения разных аспектов социального поведения на двух исследованных моделях ВЗК отражают отличия в механизмах реализации изменений в организме, развивающихся при хроническом воспалении кишечника.

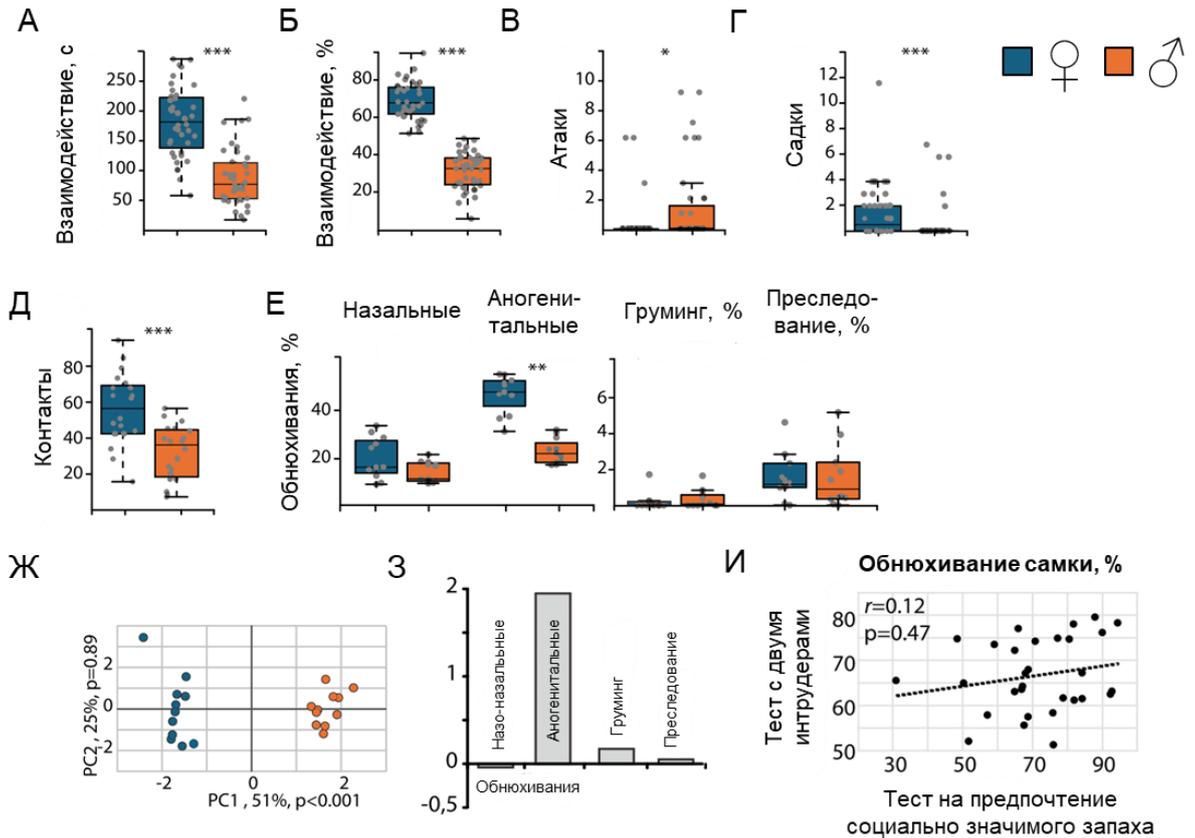


Рисунок 23. Взаимодействие самца-резидента с самцом- и самкой-интродерами.

А. Продолжительность социального взаимодействия с интродерами (преследование и обнюхивание), *** = $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов, $n = 40$. **Б.** Доля времени социального взаимодействия с интродерами (преследование и обнюхивание), % от общего времени взаимодействия, *** = $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов, $n = 40$. **В.** Количество атак самцом-резидентом интродеров, * = $p < 0.05$, точный тест Фишера, $n = 40$. **Г.** Количество садок на интродеров самцом-резидентом, *** = $p < 0.001$, точный тест Фишера, $n = 40$. **Д.** Количество социальных контактов резидента с интродерами, *** = $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента для зависимых образцов, $n = 20$. **Е.** Распределение типов поведения самца-резидента в ходе социального взаимодействия: продолжительность назальных и аногенитальных обнюхиваний, груминга и преследования интродеров, доля от общего времени взаимодействия, ** = $p < 0.01$, критерий Уилкоксона, $n = 11$. **Ж.** Анализ поведения резидента с помощью метода главных компонент. **З.** Вклад отдельных типов поведения в главные компоненты. **И.** Корреляция между временем взаимодействия самца-резидента с самкой в тесте с двумя интродерами (доля от общего времени взаимодействия) и продолжительностью обнюхивания образца запаха самок в тесте на выбор социально значимого запаха, $p = 0.47$, коэффициент корреляции Спирмена, $n = 30$.

[Введите текст]

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Взаимодействие в оси «микробиота – кишечник – мозг» на модели генетически обусловленного воспаления кишечника

4.1.1. Оценка нарушения кишечного барьера и анализ причин повышенной проницаемости кишечника у мышей с нокаутом гена *Muc2*

Мыши с нокаутом в гене, кодирующем муцин-2, широко используются в качестве модели ВЗК [12], [141] [193] [194]. Поскольку течение ВЗК у мышей зависит от множества факторов, таких как линия животных, условия содержания и статус здоровья [195], [196], требовалось оценить, насколько уровень кишечного воспаления у мышей *Muc2*^{-/-} согласуется с приведенными в литературе данными [11], [12]. По данным гистологического анализа воспаление в кишке мутантных мышей можно охарактеризовать как хроническое, при этом наблюдались гиперплазия крипт и инфильтрация эпителия ПМЯ клетками (Рисунок 6 А,Б), однако язвы и значительные повреждения эпителия отсутствовали. Оценка по клинической шкале у мутантных мышей была достоверно выше, чем у дикого типа *Muc2*^{+/+} и контрольной группы C57Bl (Рисунок 6Г). Наши данные подтверждают ранее опубликованные исследования на мышах линии *Muc2*^{-/-} [12], [197] и описывают характеристики воспаления у пациентов с ВЗК [198], [199]. Еще одной особенностью хронического кишечного воспаления является повышенная проницаемость кишки, как описано у пациентов [67], [200]. Однако имеющиеся в литературе данные о фенотипе «дырявого кишечника» ранее не позволяли сделать однозначный вывод: сообщалось как о повышении проницаемости [201], так и об отсутствии влияния мутации в гене, кодирующем муцин-2 [83], [84], [202]. Нарушения барьерной функции кишки у *Muc2*^{-/-} мышей наблюдали при инфекциях, таких как *Citrobacter rodentium* [83], *Salmonella enterica* [202] или *Entamoeba histolytica* [84]. Такие расхождения в полученных данных могут следовать из различий в статусе здоровья животных либо из различий в применении нормировки при проведении исследований проницаемости кишки, поскольку в данных статьях описаны не все детали. В нашем исследовании у самцов мышей линии *Muc2*^{-/-} присутствовала значительная кишечная проницаемость для 4 кДа FITC-Dextran (Рисунок 6В), при этом в эпителии кишки у этих животных с помощью ПЭМ были обнаружены структурные дефекты ПК. Среди структурных дефектов ПК обнаруживали увеличение ширины ПК, появление «пузырьков» вплоть до деструкции плотных контактов (Рисунок 7

А). О подобных нарушениях сообщалось в статьях об исследованиях мутаций с потерей функции в компонентах ПК [203], [204], о бактериальных инфекциях [205], [206], воспалении, ВЗК и БК [81], [207], [208]. Такие нарушения структуры ПК вызывают увеличение проницаемости кишки и объясняют «синдром дырявого кишечника» у мышей с нокаутом в гене, кодирующем муцин-2. В совокупности наши данные позволяют заключить, что у мышей линии *Muc2^{-/-}* наблюдается «синдром дырявого кишечника» в присутствии умеренного воспаления и согласуется с данными, полученными у пациентов с ВЗК [209].

4.1.2. Микробиота как ключевой фактор формирования поведенческих реакций у мышей линии *Muc2^{-/-}* и их однопометников без мутации

Модель колита на мышах линии *Muc2^{-/-}* демонстрирует основные черты хронического кишечного воспаления, что подтверждается оценками по клинической и гистологической шкале колита (Рисунок 6 Б,Г). У самцов линии *Muc2^{-/-}* были обнаружены интересные особенности социального поведения (Рисунок 12,13). В то же время, у мутантных самцов не было отмечено тревожного поведения, характерного для других моделей ВЗК и описанного в исследованиях на людях [5], [22], [210]. Такое наблюдение позволило предположить, что на поведение самцов главным образом влияет не воспаление, а другой фактор – кишечная микробиота. И действительно, результаты экспериментов на самцах группы *Muc2^{+/+}* подтверждают эту гипотезу: садки на самцов и атаки самок демонстрировали и самцы *Muc2^{+/+}*, но не C57BL/6 (Рисунок 12). Несмотря на различия в морфологии кишки, самцы из одного разведения (*Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}*) сохраняли сходство состава кишечной микробиоты (Рисунок 15 А,Б). Как известно, сиблинги получают микробиоту от матери. В ходе взросления микробиота созревает и меняется, однако по достижении определенного возраста состав микробиоты стабилизируется и позже хоть и может существенно изменяться из-за болезней либо воздействия лекарств, однако, при исчезновении модифицирующих факторов вполне вероятно возвращение состава микробиоты к тому состоянию, которое было сформировано в юном возрасте [20]. В исследованиях с участием новорожденных детей было показано, что материнские штаммы бактерий более стабильно колонизируют кишечник, чем штаммы, для которых не была показана связь с материнским организмом [211]. Влияние кишечной микробиоты на поведение млекопитающих описано во многих трудах. Материнскую же микробиоту считают причиной изменения поведения не имеющей генетической природы, но передающейся по наследству [212].

[Введите текст]

Основные возможные пути влияния микробиоты на поведение представлены следующим образом: через блуждающий нерв, через метаболиты бактерий, через иммунные клетки хозяина [151]. Самцы мышей с нокаутом в гене, кодирующем муцин-2 (*Muc2^{-/-}*), демонстрируют изменения в поведении, которые, скорее всего, обусловлены изменениями микробиоты кишечника, нежели являются следствием воспалительных реакций в кишечнике. У самцов мышей группы *Muc2^{+/+}* тоже отмечали особенности в поведении, аналогичные наблюдаемым у мышей *Muc2^{-/-}*, однако при этом у самцов *Muc2^{+/+}* отсутствует воспаление в кишке (Рисунок 6), а проницаемость кишечника для молекул 4 kDa находится на уровне значений контрольной линии C57BL/6 (Рисунок 6). Можно предположить, что в данной модели ВЗК изменения поведения у мышей группы *Muc2^{+/+}* обусловлены влиянием бактерий на деятельность блуждающего нерва [123] либо на работу других клеток, что приводит к изменению уровня метаболитов в головном мозге и влияет на активацию нейронов ВМГ. Результаты ЯМР головного мозга позволяют предположить, что глицин может быть потенциальным медиатором, обеспечивающим поведенческие паттерны, наблюдаемые на модели колита у мышей *Muc2^{-/-}*.

4.1.3. Роль бактерий вида *A. muciniphila* в регуляции поведения

Роль микробиоты в изменении поведения самцов с нокаутом в гене, кодирующем муцин-2, также была показана в серии экспериментов с изменением состава бактериального сообщества с помощью предоставления самцам мышей антибиотиков (опубликовано автором диссертационного исследования совместно с Морозовой М.В. и соавторами, [186]). При исследовании бактериального сообщества кишки мышей для *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}* было показано увеличение содержания бактерий *Akkermansia muciniphila* по сравнению с C57BL/6. Предоставление мышам *Muc2^{+/+}* антибиотика широкого спектра действия амоксициллина с клавулановой кислотой (АМК) привело к снижению уровня *A. muciniphila* у этих мышей, а также к снижению двигательной активности (пройденного пути) и увеличению тревожности (в эксперименте было отмечено как снижение времени в центре) в тесте открытого поля, т.е. нормализации поведения. Увеличение же уровня *A. muciniphila* у мышей C57BL/6 с помощью предоставления смеси антибиотиков ванкомицина и рифампицина привело к увеличению пройденного пути в ОП (на уровне тенденции), а также к нивелированию предпочтения самки в тесте с двумя интродерами. Результаты этих двух экспериментов позволили предположить, что поведенческие изменения у животных линий *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}* связаны с уровнем конкретной бактерии - *A. muciniphila*. Предоставление смеси антибиотиков ванкомицина и рифампицина самцам мышей линии [Введите текст]

BALB/c также приводило к отсутствию предпочтения самки в тесте с двумя интродерами [213]. В тесте «открытое поле» у этой линии мышей не наблюдалось неблагоприятного воздействия ванкомицина и рифампицина на двигательную активность или общую тревожность. Мыши линии BALB/c характеризуются преобладанием Th2 иммунного ответа, в отличие от мышей линии C57BL/6, у которых преобладает Th1 иммунный ответ. Эти данные позволяют предположить, что полученные результаты возможно воспроизвести на линиях мышей с другим генетическим бэкграундом.

A. muciniphila обычно ассоциируется со здоровым состоянием кишечника и положительным влиянием на физиологию хозяина, при этом является видом, разрушающим муцин [214], [215]. Увеличение содержания этой бактерии в кишечнике животных при нокауте в гене, кодирующем муцин-2, является парадоксальным, учитывая природу этой мутации. Вероятно, снижение численности других комменсальных видов бактерий, таких как *Escherichia* и *Blautia*, обеспечивает нишу для *Akkermansia* в кишечнике. В то же время, ряд муцинов, связанных с мембраной, присутствует по всей протяженности ЖКТ [216]. Возможно, что отсутствие муцина-2 облегчает доступ к другим муцинам, которые могут быть предпочтительным источником для *Akkermansia*.

В подтверждение полученных данных, опубликованные данные указывают на то, что пробиотическая терапия *A. muciniphila* уменьшает депрессию, проявления тревожного и повторяющегося поведения, а также смягчает нарушения обучения и памяти на различных моделях на мышах [217], [218], [219], [220]. На мышинной модели аутичного поведения, индуцированного вальпроевой кислотой (ВПК), было показано, что предоставление *Akkermansia spp.* смягчало социальные нарушения, вызванные воздействием ВПК, посредством активации дофаминергических нейронов в вентральной области покрышки [221]. В то же время, публикации о влиянии *Akkermansia* на регуляцию поведения при взаимодействии с интродерами-самцами и самками отсутствуют. Полученные в данной работе данные свидетельствуют о том, что именно кишечная микробиота играет существенную роль в реализации агрессивного и полового поведения, и при этом непосредственно участвует бактерия *A. muciniphila*.

4.1.4. Взаимосвязь микробиоты и метаболизма в контексте нарушений поведения

Поскольку связь «микробиота – кишечник – мозг» у млекопитающих обеспечивается с помощью различных механизмов, в том числе и с участием метаболитов, в данной работе [Введите текст]

были проанализированы профили метаболитов крови и головного мозга у мышей трех исследованных групп (опубликовано автором диссертационного исследования совместно с Морозовой М.В. и соавторами, [186]). Ранее уже было опубликовано, что метаболический профиль крови изменяется в сочетании с переносом микробиоты мутантных животных во время совместного содержания, что подтверждает значительный вклад микробиоты в метаболизм хозяина [222], [223]. В данной работе метаболический профиль головного мозга не изменялся значимо после сдвигов в микробиоте, однако было обнаружено изменение уровня глицина, потенциального нейромедиатора, участвующего в реализации наблюдаемого поведенческого фенотипа. Чтобы разобраться в том, какую роль выполняет глицин в регуляции поведения самцов групп *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}*, его уровень пробовали нормализовать с помощью ингибирования глициновых рецепторов (GlyR) и глицин-связывающих сайтов на NMDA-рецепторах. Ингибирование глициновых рецепторов с помощью инъекции стрихнина у самцов мышей *Muc2^{-/-}* привело к снижению двигательной активности в тесте «открытое поле» и восстановлению социального поведения в тесте с двумя интродерами. Ингибирование глицин-связывающих сайтов на NMDA-рецепторах снижало активность животных в тесте «открытое поле», но не влияло на социальное поведение. В целом, использование ингибиторов глицина подтверждает роль обоих видов рецепторов в регуляции сложного поведенческого фенотипа, который наблюдается у самцов мышей с нокаутом в гене, кодирующем муцин-2 [186]. Для глицина уже был ранее описан эффект смягчения тревожного поведения и обсессивно-компульсивного расстройства [187], [188]. Вклад в модуляцию тревожного поведения показан для возбуждающих глициновых рецепторов (eGlyR), преимущественно представленных в вентральном гиппокампе [224]. Скорее всего, снижение тревожности под действием глицина частично маскирует влияние воспаления на поведение, что объясняет отсутствие тревожного поведения у мутантных самцов (Рисунок 11). По результатам полученных данных можно предположить, что глицин является главным регулятором оси «микробиота – кишечник – мозг» на модели колита с дефицитом муцина-2.

Анализ профилей метаболитов крови и головного мозга позволил предположить звенья-кандидаты, участвующие в регуляции поведения самцов. Возможной причиной увеличения уровня глицина в головном мозге могут быть бетаин и холин крови, которые связаны с бактериальным метаболизмом [225]. Уровни холина и бетаина в крови были увеличены и у *Muc2^{-/-}*, и у *Muc2^{+/+}* самцов (Рисунок 15 В). Холин и бетаин являются предшественниками синтеза глицина [190], [226], и, возможно, повышение их концентрации обеспечило увеличение уровня глицина в мозге. Холин способен проникать [Введите текст]

через ГЭБ [227] и смягчать тревожное и компульсивное поведение на мышинной модели аутизма [228]. Похожие эффекты были показаны для продукта метаболизма холина – бетаина [229], [230]. Описанные эффекты похожи на наблюдаемое поведение животных линии *Muc2^{-/-}*, поэтому холин и бетаин можно рассматривать как возможные промежуточные звенья цепи «микробиота – кишечник – мозг».

Существует несколько путей, с помощью которых холин может влиять на функцию ЦНС, включая увеличение концентрации ацетилхолина в мозге [231], [232]. В проведенном эксперименте ацетилхолин не изучали, поскольку не наблюдали увеличения концентрации холина в мозге, что говорит о его быстром метаболизме на периферии, что согласуется с увеличением уровня бетаина в крови. В свою очередь, свободный холин либо поступает из пищи, либо образуется из фосфатидилхолина, основного депо холина [233], [234]. Возможный механизм может включать в себя сдвиги метаболизма фосфолипидов в кишечнике, вызванные *Akkermansia muciniphila* через Toll-like рецепторы [235]. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что для мышей *Muc2^{-/-}* описано нарушение энергетических процессов и активация липидного метаболизма [236], [237]. Тем не менее, до конца неясно, что первично, нарушения метаболизма, которые приводят к формированию измененного микробного сообщества, или же отсутствие муцина-2, которое приводит к изменению микробиоты, а уже затем и к изменениям метаболизма. Есть предположение, что будет очень важно дальше исследовать эти взаимодействия, потому что это может помочь определить мишень для терапии неврологических расстройств при ВЗК.

4.1.5. Особенности полового и агрессивного поведения в генетически-обусловленной модели колита

Исследование поведения самцов мышей групп *Muc2^{-/-}* и *Muc2^{+/+}* позволило обнаружить интересный поведенческий фенотип. Самцы обеих групп демонстрировали снижение времени контакта с самкой-интродером и увеличение времени контакта с самцом-интродером, садки на самцов и атаки самок в тесте с двумя интродерами. Нейрональная активация в ВМГ также отражала усиление реакции при взаимодействии с самцом-интродером у самцов с нокаутом в гене муцина-2 (Рисунок 13 В). В большинстве случаев садки на самца являются проявлением агрессивного поведения [238]. В очень редких случаях садки на самца свидетельствуют об измененном восприятии конспецификов, например, из-за нарушений в восприятии феромональных сигналов [239],

однако результаты теста на предпочтение социально-значимого запаха (Рисунок 12В) не поддерживают это предположение в данном эксперименте.

Исследования нейрональной активации в головном мозге показали, что специфичные для самцов и самок сигналы активируют как отдельные, так и общие районы в головном мозге [240]. Предполагается, что каждую последовательность инстинктивного поведения можно разделить на вариабельную appetитивную фазу (поисковые действия) и стереотипную консумматорную фазу. У грызунов appetитивная фаза как спаривания, так и агрессии включает в себя приближение и исследование социального стимула. Последующая консумматорная фаза спаривания включает в себя садку, интромиссию и эякуляцию, тогда как нападение является основным консумматорным действием агрессии. По мере того, как спаривание и агрессия переходят от appetитивной фазы к консумматорной, поведение животного, а также вовлеченные области мозга становятся все более различными (Рисунок 24).

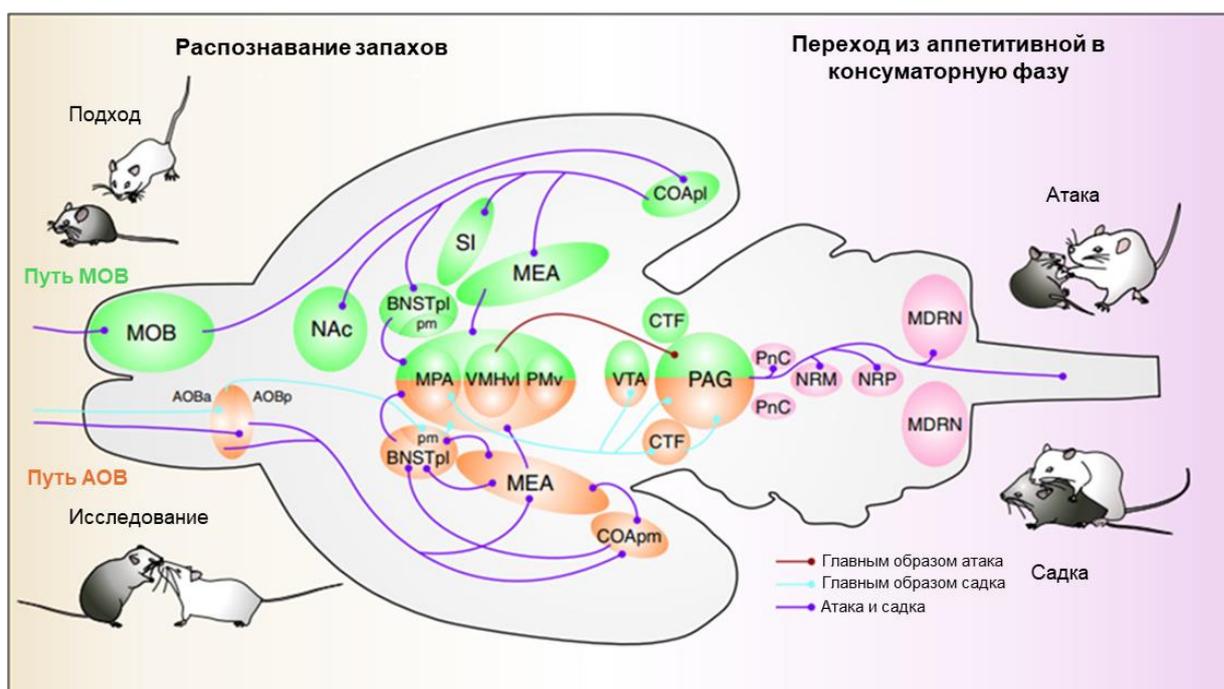


Рисунок 24. Нейронные контуры, участвующие в различных фазах агрессивного и полового поведения у грызунов. Красные, синие и фиолетовые линии обозначают пути, главным образом задействованные в ходе атак, садок либо в обоих типах поведения. АОВа: передняя дополнительная обонятельная луковица; АОВр: задняя АОВ; BNSTpl/pm: заднелатеральное/заднемедиальное ядро ложа терминальной полоски; COApl/pm: заднелатеральное/заднемедиальное корковая амигдала; CTF: центральное поле покрывки; MDRN: ретикулярное ядро продолговатого мозга; MEA: медиальная амигдала; [Введите текст]

МОВ: главная обонятельная луковица; МРА: медиальная преоптическая область; NAc: прилежащее ядро; NRM: большое ядро шва; NRP: бледное ядро шва; PAG: околотоводопроводное серое вещество; PnC: каудальная часть моста; SI: безымянная субстанция; VTA: вентральная область покрышки. Приведено согласно работе Hashikawa с коллегами [241].

Реализация агрессивного и полового поведения начинается с распознавания обонятельных стимулов при участии основной обонятельной системы (MOS) и дополнительной обонятельной системы (AOS). AOS детектирует главным образом нелетучие запаховые молекулы посредством тесного контакта с источником запаха, тогда как MOS распознает небольшие летучие молекулы. Из основной обонятельной луковицы информация о запахе передается в пять основных нижележащих областей, включая переднее обонятельное ядро, грушевидную кору, обонятельный бугорок, переднюю и заднелатеральную корковую амигдалу (COAa и COAp1) и латеральную энторинальную кору. Проекции из АОВ проходят в медиальную амигдалу (MEA), заднемедиальную COA (COApm), BNST и ядро ложа дополнительного обонятельного тракта (BOAT). Основные мишени COAp1 включают ядро ложа конечной полоски (переднее, заднелатеральное и поперечное ядра), медиальную (заднедорсальную и переднюю) и центральную амигдалу, вентральную подостную область (SUBv), вентральную часть латеральной перегородки (LSv), безымянную субстанцию (SI), прилежащее ядро (NAc) и инфраламбическую область [241].

Медиальная преоптическая область (MPA), COA и вентролатеральная часть вентромедиального гипоталамуса (VMHvl) экспрессируют большое количество гормональных рецепторов и интегрируют сигналы от основной и дополнительной обонятельных систем [241]. В иммуногистохимическом исследовании, проведенном в данной работе, было выявлено увеличение количества активных нейронов ВМГ у самцов нокаутом в гене муцина-2 при взаимодействии с самцом-интродером, что подтверждает наблюдаемые поведенческие различия в реакции самцов контрольной линии и мутантных самцов на предоставление самца-интродера. Количество активированных нейронов в ВМГ при предоставлении самки не различалось у самцов мышей групп C57BL/6 и *Muc2^{-/-}*, но при этом у самцов мутантной линии наблюдались атаки на самку-интродера. В исследовании Lee и соавторов [169] показано, что нейроны вентролатеральной части ВМГ (влВМГ), содержащие эстрогеновый рецептор 1 типа (*Esr1+*), активируются и в ходе атак, и в ходе садок самца на интродера любого пола: слабая стимуляция вызывает садку, сильная – атаку.

[Введите текст]

Таким образом, изменение паттерна поведения может происходить и без изменения числа активированных нейронов. В исследовании Remedios с коллегами показано, что с приобретением опыта взаимодействия с самкой и с самцом в двух данных ситуациях у мышей активируются две разные группы нейронов влВМГ, тогда как у неопытных мышей эти популяции нейронов перекрываются [157]. Несмотря на то, что самцы мышей линии *Muc2^{-/-}* имели половой опыт с самками и социальный опыт с самцом, они одинаково часто демонстрировали садки на самцов, атаки на самок и садки на самок; различия в активации нейронов при предоставлении самца и самки не наблюдалось (Рисунок 13 В). Возможно, садки на самцов и атаки самок возникают как реализация агрессивного поведения в результате усиления стимуляции нейронов ВМГ.

Предполагается, что механизм изменения поведения самцов мышей под влиянием кишечной микробиоты (а именно, бактерии *Akkermansia muciniphila*), включает в себя стимуляцию глициновых рецепторов (GlyR) и глицин-связывающих сайтов на NMDA-рецепторах. Роль двух данных видов рецепторов в реализации социального поведения описана в ряде публикаций. Снижение экспрессии гена, кодирующего GluN2B-субъединицу глутаматного NMDA-рецептора в латеральной миндалине и снижение рецепторного тока вызывало аномальное агрессивное поведение, в том числе, в отношении самок [242]. Наличие субъединицы GluN1 в NMDA рецепторе необходимо для реализации копулятивного поведения, при этом дополнительную роль может играть дефицит социального взаимодействия [243]. У мышей со сниженной функциональностью NMDA-рецепторов показано снижение социальной коммуникации посредством ультразвуковых вокализаций [243]. В данной работе исследования ультразвуковых вокализаций у мышей *Muc2^{+/+}* и *Muc2^{-/-}* не проводилось, однако, это может быть потенциальным звеном для реализации особенностей поведения у мышей исследованных групп.

В различных исследованиях продемонстрирована важность передачи нервного импульса, опосредованного глициновыми рецепторами, в регуляции социального взаимодействия у грызунов. У самцов мышей с нокаутом в гене субъединицы $\alpha 4$ глицинового рецептора (*Glr4*) было отмечено увеличение социальной активности в домашней клетке в активный период суток (в темноте) [244]. Кроме того, показано участие глицина в регуляции социального поведения для игровой активности крыс. Игровое поведение крыс критически зависело от глицина в околосинаптическом сером веществе (PAG). Более того, возрастное снижение нейронной активности в PAG также было связано со снижением синаптического высвобождения глицина [245]. Блокада глициновых

[Введите текст]

рецепторов в медиальном преоптическом ядре (МПО) приводила к снижению сексуальной мотивации (либидо) и интромаissionного отношения у самцов крыс. Предполагается, что блокада глициновых рецепторов на some ГАМК-ергических нейронах МПО и на пресинаптических окончаниях нейронов, проецирующихся в МПО из других областей мозга, растормаживает ГАМК-ергические нейроны или их синаптические окончания, приводя к увеличению выброса ГАМК с последующим торможением нейронных контуров, контролирующих половое поведение самцов крыс [246]. Изменение активации глициновых рецепторов в МПО может быть частью механизма реализации изменений социального поведения самцов мышей на модели генетически обусловленного кишечного воспаления.

4.2. Влияние микробиоты на нарушения социального поведения на модели химически обусловленного воспаления кишечника

4.2.1. Модель воспаления и нарушения кишечного барьера у мышей с химически-индуцированным колитом

Для создания модели колита на лабораторных животных введение декстрансульфата натрия (DSS) используется в виде двух общих схем: острое краткосрочное предоставление и длительное хроническое [14], [247]. Различные авторы описывают довольно широкий спектр наблюдаемых морфологических изменений в кишке от значительного разрушения крипт до почти полного отсутствия каких-либо изменений [147], [245], [249]. В данной работе было отмечено более значительное повреждение эпителия кишки после острого воздействия DSS, чем после хронического воздействия, что согласуется с опубликованными данными [250], [251]. Воспаление можно охарактеризовать как острое либо как хроническое, в том числе и по данным экспрессии генов провоспалительных цитокинов (Рисунки 12В, 16В).

Фукозилированные гликаны представляют собой компонент муциновой выстилки кишки, то есть среды обитания комменсальных микроорганизмов [252], [253]. В некоторых исследованиях описано противовоспалительное действие фукоидана, фукоидан-содержащих экстрактов и фукозы на различных моделях в условиях *in vitro* и *in vivo* [254], [255], [256], [257]. Однако же в нашем эксперименте добавление фукозы к раствору DSS, напротив, не смягчило разрушение эпителия и не внесло значимого эффекта в морфологию кишки само по себе ни при хроническом предоставлении (Рисунок 17 А,Б), ни при моделировании острого колита (Рисунок 21 А,Б). В целом, для моделей DSS-индуцированного колита описан ряд причин, которые могут вызывать расхождения в [Введите текст]

наблюдаемой картине развития колита по сравнению с ранее опубликованными: различия используемых линий мышей, молекулярного веса используемого DSS, микробиологического статуса животных, а также кормов или других средовых факторов [149], [153], [247], [248], [258]. Возможно, и наши расхождения в наблюдаемых эффектах с фукозой обусловлены факторами среды, к примеру, в публикациях не всегда указывают микробиологический статус животных. В отличие от авторов одной из статей [259], нам не удалось обнаружить какого-либо влияния фукозы на воспаление в кишечнике. В то же время исследователи в приведенной статье добились развития острого колита с менее выраженными симптомами, о чём можно судить по 3–4-кратному увеличению экспрессии генов провоспалительных цитокинов [259], по сравнению с 15–500-кратным увеличением экспрессии, обнаруженном в настоящем исследовании. Таким образом, возможно, что в случае тяжёлого колита фукоза не сохраняет своего смягчающего эффекта при воспалении.

4.2.2. Особенности метаболизма мышей с хроническим химически индуцированным колитом

Хронический колит, вызванный DSS, повлиял на уровни некоторых метаболитов в крови мышей, как свидетельствуют результаты ЯМР-спектроскопии. Эти метаболические изменения могут отражать как нарушения в организме млекопитающего, так и сдвиги состава кишечной микробиоты. Моделирование колита с помощью предоставления DSS может приводить к значительно выраженным изменениям кишечной микробиоты [260], [261], а модификации в микробиоте могут влиять на метаболизм хозяина. Среди результатов исследования было отмечено снижение уровня триптофана в сыворотке крови в группе животных с хроническим потреблением DSS. В литературе эффект снижения уровня триптофана в плазме крови описан для людей с острой и хронической формой ВЗК [262], [263] и для мышей с острым колитом, индуцированным DSS [264], [265]. Поскольку такого существенного снижения уровня других аминокислот не наблюдалось, можно предположить, что снижение триптофана в сыворотке крови мышей не связано со снижением потребления пищи либо с нарушением всасывания питательных веществ в кишечнике.

Было предположено, что снижение уровня триптофана при хроническом воспалении вызвано повышенным катаболизмом триптофана по кинурениновому пути. Ключевыми регуляторами этого процесса являются провоспалительные цитокины и индоламин-2,3-диоксигеназа 1 (IDO1) – один из ферментов, катализирующих лимитирующую стадию

[Введите текст]

кинуренинового пути [264], [265]. В данном исследовании наблюдалось существенное увеличение экспрессии гена *Ido1*, при этом предоставление фукозы совместно с хроническим предоставлением DSS нормализовало уровень триптофана в крови, но не влияло ни на уровень экспрессии гена *Ido1*, ни на уровни экспрессии генов провоспалительных цитокинов (опубликовано автором диссертационного исследования совместно с соавторами, [173]). Эти результаты позволяют предположить, что существуют другие механизмы регуляции метаболизма триптофана при развитии хронического воспаления.

Известно, что кишечные бактерии способны синтезировать триптофан [191], [266], поэтому было сделано предположение, что наблюдаемое снижение уровня триптофана при хроническом колите, вызванном DSS, может происходить из-за снижения количества триптофан-продуцирующих бактерий. И действительно, у мышей группы DSS было обнаружено снижение количества триптофан-продуцирующих *E. coli* и *Bifidobacterium* (B). Добавление фукозы нормализовало уровень *E. coli* (группа DSS+фукоза, Рисунок 20B), при этом уровень триптофана в сыворотке крови увеличился до значений контрольной группы (Рисунок 20A). Предполагается, что именно уменьшение количества триптофан-продуцирующих бактерий при хроническом воспалении привело к снижению уровня триптофана в сыворотке крови.

4.2.3. Роль микробиоты в формировании поведения у мышей после химической индукции колита

Считается, что снижение уровня триптофана, по крайней мере, частично вносит вклад в развитие депрессии у пациентов с ВЗК. Триптофан является предшественником серотонина, нейромедиатора, участвующего в регуляции социального поведения [267]. Согласно полученным данным, DSS-индуцированный хронический колит приводил к нарушению социального поведения: самцы мышей после хронического предоставления DSS не предпочитали запах самок запаху самцов (Рисунок 18A), тогда как их способность к распознаванию несоциального запаха и общая двигательная активность не отличались от способностей контрольной группы (Рисунок 18 Б, В). Эти данные согласуются с предыдущими исследованиями, в которых отмечалось, что самцы мышей, у которых отсутствует серотонин в головном мозге, не проявляют предпочтения между запахами самцов и самок [268]. Следовательно, снижение уровня триптофана может объяснить фенотип социального поведения при хроническом DSS-индуцированном колите. Эта

[Введите текст]

гипотеза подтверждается результатами эксперимента с введением животным с хроническим DSS-индуцированным колитом предшественника серотонина (5-HTP), что привело к восстановлению поведенческого фенотипа, а именно восстановлению предпочтений запаха самок у самцов в тесте на выбор социально-значимого запаха (Рисунок 21А).

Для того, чтобы проверить, приводит ли снижение количества *E. coli*, способной продуцировать триптофан, к поведенческому фенотипу, описанному выше, был использован антибиотик рифампицин для снижения содержания триптофан-продуцирующих *E. coli*. Самцы, которые потребляли рифампицин, демонстрировали такое же поведение в тесте на выбор социально-значимого запаха, как и самцы с хроническим DSS-индуцированным колитом, а именно не демонстрировали предпочтения запаха самок (Рисунок 21Б). Этот результат подтверждает гипотезу о том, что отсутствие предпочтения в тесте с социально-значимыми запахами при хроническом DSS-индуцированном колите зависит от доступности кишечной триптофан-продуцирующей *E. coli*.

В литературе показано, что предоставление рифампицина приводит к значительным изменениям разнообразия кишечной микробиоты, увеличению представленности *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia* с сопутствующим снижением *Firmicutes* [269]. Эффекты рифампицина на кишечную микрофлору у самцов мышей были показаны Морозовой и коллегами: биологическое разнообразие кишечной микробиоты после потребления рифампицина существенно не изменялось, что подтверждалось индексами разнообразия Шеннона и Симпсона. Рифампицин подавляет как грамположительные (*Bacteroides*, *Prevotella*), так и грамотрицательные (*Escherichia*, *Klebsiella*) таксоны, часто приводя к снижению численности *Firmicutes* и увеличению количества условно-патогенных микроорганизмов, таких как *Enterococcus spp* [213].

Эффекты рифампицина на поведение самцов мышей были показаны Морозовой и коллегами и опубликованы [213]. Потребление рифампицина самцами мышей приводило к увеличению пройденного расстояния в тесте «открытое поле» и количества вертикальных стоек, что указывало на повышение моторной активности в новом окружении. В то же время, потребление рифампицина снижало продолжительность взаимодействия с самкой-интродером по сравнению с контрольной группой в тесте с двумя интродерами [213]. Механизм влияния рифампицина на поведение мышей довольно сложен: для него показаны как нейропротекторные свойства, так и митохондриальная токсичность [270, 271]. В публикации Морозовой с соавторами [213] показано сохранение поведенческих эффектов

[Введите текст]

антибиотиков (рифампицин+ванкомицин) в течение 3,5 недель после их отмены. Предположительно, именно долгосрочное нарушение микробного сообщества повлияло на социальные предпочтения самцов мышей, а не антибиотики сами по себе [213].

4.2.4. Влияние фукозы на формирование микробиологического и метаболического профиля и поведенческих нарушений

Предоставление фукозы нивелировало эффект хронического воздействия DSS на предпочтение запаха в тесте на предпочтение социально-значимого запаха и приводило к значительному увеличению времени обнюхивания подстилки самок самцами (Рисунок 18А). Этот результат подтверждает идею о том, что наблюдаемые поведенческие изменения связаны с бактериальными сдвигами в кишечнике. Также можно предположить, что фукозу либо ее производные можно использовать в качестве потенциальных модуляторов поведенческих отклонений, наблюдаемых при ВЗК. В исследовании Парк и коллеги [272] показали, что отсутствие фукозомутаротазы (фермента, который облегчает включение фукозы в белок) приводило к поведению у самок мышей, аналогичному половому поведению самцов. Хотя авторы не рассматривали возможное участие микробиоты в реализации поведенческого фенотипа, кишечные бактерии и их метаболизм могут влиять на поведение животных с отсутствием фукозомутаротазы.

Полученные данные подтверждают, что основным фактором, модулирующим поведение у животных, получавших DSS, является скорее микробиологический статус, чем воспаление в кишке. В исследованиях Yirmiya с соавторами показано, что повышенные уровни провоспалительных цитокинов не оказывали влияние на половое поведение самцов [273], [274]. Известно, что некоторые штаммы *Bacteroides* синтезируют фукозидазы, которые отщепляют L-фукозу от гликанов хозяина, таким образом, переводя ее в доступную для других бактерий форму [143], сами бактерии используют фукозу как структурный компонент своих полисахаридов и гликопротеинов [275]. В случае DSS-индуцированного колита добавление L-фукозы может восстановить возможный недостаток свободной фукозы, оказывая влияние на ЦНС.

В данном эксперименте добавление фукозы в питье мышей восстанавливает поведение самцов в тесте на выбор социально-значимого запаха после хронического потребления DSS. Дополнительно нами был проведен эксперимент по изучению поведения самцов мышей линии *Muc2^{-/-}* после поения 0,1% раствором L-фукозы в течение двух недель (данные не представлены). Поение фукозой не повлияло на количество садок на самца-
[Введите текст]

интродера и атак самки-интродера в ходе теста с двумя интродерами у самцов мышей линии *Misc2^{-/-}*. Наши данные позволяют заключить, что потребление фукозы влияет на восприятие либо предпочтение запахов у самцов мышей, однако не оказывает выраженного действия при предоставлении животному интродеров разного пола. Показано, что фукоза, кроме влияния на состав микробиома, сама по себе способна выступать в качестве нейромодулятора и смягчать нарушения памяти у мышей [276], при этом авторы исследования предполагают, что механизм влияния фукозы на поведение скорее обусловлен ее прохождением через ГЭБ, чем влиянием фукозы на кишечную микробиоту с последующим участием оси «микробиота – кишечник – мозг». Согласно результатам проведенных поведенческих тестов различия в поведении самцов группы «Фукоза» по сравнению с группой «Контроль» были отмечены только в тесте с двумя интродерами: самцы, потреблявшие фукозу, демонстрировали атаки на самку-интродера (Рисунок 19А). Усиление проявления агрессивного поведения самцами группы «Фукоза» было отмечено только в данном тесте, и это было единственным отмеченным различием в поведении самцов данной группы по сравнению с Контролем, как при краткосрочном (Рисунок 22), так и при длительном предоставлении фукозы в питье (Рисунок 18,14).

В данном исследовании продемонстрировано, что изменение микробиоты хозяина моносахаридом L-фукозой не влияло на выраженность химически-индуцированного хронического колита с точки зрения воспалительной реакции кишечника, но частично смягчало изменения метаболизма и поведения. Поскольку L-фукоза является простым и доступным сахаром, она может стать перспективной стратегией для разработки препаратов, модифицирующих микробиоту и метаболизм, для воздействия на конкретные аспекты различных заболеваний. Подобные соединения могут расширить спектр клинических подходов и обеспечить экономически привлекательную альтернативу пребиотическим и пробиотическим системам для терапии ВЗК

4.2.5. Особенности поведения самцов мышей при химической индукции колита

При остром и хроническом DSS-индуцированном колите самцы мышей не демонстрировали выраженного предпочтения запаха самки в тесте на выбор социально-значимого запаха (Рисунок 18А, 17Г). Нарушение предпочтений социально-значимого запаха на фоне хронического DSS-индуцированного колита не сопровождалось существенными изменениями в поведении самцов мышей при взаимодействии с двумя интродерами разного пола (Рисунок 19). Было отмечено, что доля животных,

[Введите текст]

демонстрировавших атаки на самок во время теста с двумя интродерами была выше для групп DSS и Фукоза по сравнению с контролем (Рисунок 19А). Тем не менее, другие характеристики взаимодействия резидента с интродерами не отличались у животных исследованных групп между собой (Рисунок 19 Б, В,Г). Изменения запаховых предпочтений у самцов мышей на модели хронического DSS-индуцированного колита связаны с уровнем триптофана в крови исследованных животных, что подтверждается результатами эксперимента по восстановлению предпочтения запаха самок после введения самцам предшественника серотонина 5-НТФ (Рисунок 21А). Похожий фенотип описан для мышей с отсутствием триптофангидроксилазы-2 – фермента, лимитирующего образование серотонина в мозге. Самцы мышей, у которых практически полностью отсутствовали серотонинергические нейроны в головном мозге (*Lmx1b*^{-/-}), не проявляли предпочтения между запахами самцов и самок [268]. Однако, самцы мышей *Lmx1b*^{-/-} также демонстрировали садки на самок, в отличие от животных с DSS-индуцированным колитом (Рисунок 19 А). Связь DSS-индуцированного колита и серотонинергической системы также показала другая группа авторов. DSS-индуцированный колит приводил к изменениям в серотонинергической системе в префронтальной коре головного мозга мышей, а также проявлениям депрессивно-подобного поведения [277].

Серотонин играет важную роль в развитии нервной системы, в том числе регулируя нейрогенез, апоптоз, разветвление аксонов, дендритогенез и формирование нейронных связей в развивающемся мозге, участвует в регуляции различных процессов в ЦНС, включая контроль движений, боль, аппетит, вознаграждение, импульсивность и компульсивность, обучение и память, а также настроение и эмоции, тревожность, социальное и половое поведение. Серотониновая система вовлечена в различные нейropsychиатрические расстройства, такие как тревожные расстройства, депрессия и расстройства аутистического спектра (РАС), при этом селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС) являются препаратами первой линии для их лечения [278], [279], [280].

Нейрональный контроль социального поведения включает в себя различные анатомические и нейрохимические системы мозга, включая повсеместно распространенные серотонинергические пути. Дорсальное и срединное ядра шва (DRN и MRN) являются ядрами серотонинергических нейронов [281]. Гипоталамус участвует в регуляции полового поведения и иннервируется серотонинергическими волокнами, с наибольшей концентрацией в латеральной, медиальной и инфундибулярной областях. Латеральная

[Введите текст]

область связывает гипоталамус со структурами лимбической системы, корой и стволом мозга [282].

Гены, кодирующие ключевые ферменты метаболизма серотонина (триптофангидроксилаза-2 и МАО-А), серотониновый транспортер, рецепторы серотонина 5-НТ_{1А} и 5-НТ_{1В}) относятся к группе генов, модулирующих агрессивное поведение [283], [284]. Серотониновые рецепторы изучались в доклинических и клинических исследованиях на предмет их роли в развитии психических заболеваний, а также, в частности, агрессивного поведения. У мышей с нокаутом в гене, кодирующем рецептор 5-НТ_{1А}, наблюдалось снижение уровня агрессии, тогда как у мышей с нокаутом в гене, кодирующем рецептор 5-НТ_{1В}, напротив, агрессивное поведение усиливалось. Доклинические и клинические исследования также указали на участие рецепторов 5-НТ₂ в агрессивном и импульсивном поведении. У мышей с нокаутом в гене, кодирующем моноаминоксидазу А, и, как следствие, повышенным уровнем серотонина в мозге, наблюдалось уменьшение депрессивно-подобного поведения и тревожности, но повышение агрессивности [285]. Дополнительные доказательства участия триптофангидроксилазы-2 в контроле агрессивного поведения были получены в экспериментах по селективному выведению неагрессивного поведения. Было обнаружено, что селекция крыс по отсутствию агрессии сопровождалась заметным изменением метаболизма серотонина в мозге. Более высокая концентрация 5-НТ и его основного метаболита, 5-гидроксииндолилуксусной кислоты (5-НИАА), и повышенная активность триптофангидроксилазы-2 были обнаружены в среднем мозге крыс с генетически детерминированной низкой агрессивностью по сравнению с высокоагрессивными крысами. Аналогичные изменения в метаболизме 5-НТ были обнаружены у серебристо-черных лисиц, селективно разводимых в течение более 30 лет на неагрессивное поведение по отношению к человеку [283].

Рецепторы 5-НТ участвуют в регуляции половой активации самцов. Различные типы и даже подтипы одного и того же типа серотониновых рецепторов оказывают разное действие, как ингибирующее, так и активирующее, на активацию гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса в присутствии рецептивных самок. Блокада активации гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса, вызванной присутствием самок, по-видимому, связана с рецепторами 5-НТ_{1А} и 5-НТ_{2С}, тогда как активация – с рецепторами 5-НТ_{2А} и 5-НТ₃[286]. Серотонин может оказывать тормозящее действие на половое поведение самцов, хотя агонисты некоторых подтипов рецепторов 5-НТ (5-НТ_{1А} и 5-НТ_{2С}) способствуют эрекции либо эякуляции (за исключением мышей) [287]. Рецепторы 5-НТ_{2А}

[Введите текст]

также способствуют эякуляции, тогда как 5-HT_{1B} демонстрировали противоположную активность и скорее ингибировали эякуляцию [288].

Показан ряд генетических полиморфизмов в серотониновой системе, связанных с низким половым влечением у людей [289]. Кроме того, считается, что изменения в функционировании серотониновой системы способствуют сексуальной дисфункции, возникающей после лечения антидепрессантами, такими как селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС) [290], [291]. Аналогичные побочные эффекты СИОЗС показаны и на лабораторных животных: микроинъекция СИОЗС в латеральном гипоталамусе подавляла копуляцию [292]. Для самок показано участие серотониновых рецепторов в регуляции полового поведения, а именно демонстрации лордоза [293].

Таким образом, причины изменений агрессивного и полового поведения могут быть как наследуемыми, так и возникающими в течение жизни, к примеру, в результате воздействия фармакологически активных веществ. Изменения предпочтений социально-значимого запаха у самцов мышей происходят уже через одну неделю после начала развития острого химически-индуцированного колита (Рисунок 22Г). В данной работе не было проведено исследований микробиоты и поведения самцов мышей после отмены предоставления DSS и восстановления структуры слизистой оболочки кишки. Продолжение исследований эффектов метаболитов бактерий на социальное поведение важно и для оценки сроков восстановления поведенческих паттернов после прекращения воздействия на серотонинергическую систему. Поскольку депрессия зачастую сопутствует ВЗК [294], при этом для коррекции депрессии пациентам часто назначают СИОЗС, понимание работы серотонинергической системы при ВЗК поможет в снижении частоты возникновения побочных эффектов в ходе терапии и восстановления.

4.3. Сравнительный анализ поведения в двух моделях хронического колита

4.3.1. Сравнение поведения и нейромедиаторных систем, задействованных в реализации фенотипов на двух моделях колита

В поведенческих тестах, проведенных с использованием животных в двух исследованных моделях хронического воспаления кишечника, были отмечены интересные особенности. Для самцов мышей на модели генетически обусловленного хронического воспаления отмечено снижение тревожного и стереотипного поведения, а также отсутствие выраженного предпочтения самки-интродера в тесте с двумя интродерами (Рисунок 11, 12). Для самцов мышей с химически индуцированным кишечным воспалением отмечено

[Введите текст]

отсутствие предпочтения запаха самки в тесте на выбор социально-значимого запаха, при этом поведение в других проведенных тестах не отличалось от поведения животных контрольной группы (Рисунок 18, 19). Для обеих моделей хронического воспаления отмечены изменения состава кишечной микрофлоры, как характерная особенность ВЗК [295]. Также в обеих моделях хронического кишечного воспаления присутствовали сдвиги в профиле метаболитов (Рисунок 15, 20), а также была показана связь нейромедиатора либо его предшественника (глицина либо триптофана) с поведенческим фенотипом в каждой модели (Рисунок 20, [186]). Основные результаты, полученные в ходе экспериментальной части работы представлены в таблице №8.

Таблица 8. Сравнение результатов, полученных в ходе экспериментальной части работы на двух моделях хронического колита.

Модель	<i>Muc2</i> ^{-/-}	DSS-индуцированный колит
Развитие колита	Вскоре после рождения	Индукционирован у взрослых животных
Характер воспаления	Хроническое	Хроническое
Изменение кишечной микробиоты	Повышение уровня <i>Akkermansia muciniphila</i>	Снижение уровня триптофан-продуцирующих бактерий
Изменение профиля метаболитов	Увеличение уровня глицина в головном мозге	Снижение уровня триптофана в крови
Особенности тревожного и стереотипного поведения	Снижение выраженности по сравнению с C57BL/6	Нет
Нарушения поведения при взаимодействии с самкой- и самцом-интродерами	Присутствуют	Отсутствуют
Нарушение предпочтения запахов в тесте на выбор социально-значимого запаха	Отсутствуют	Присутствуют

Социальное поведение исследуемых животных было изменено в обеих моделях ВЗК, однако нарушения касались разных фаз социальной коммуникации. Нарушение

[Введите текст]

предпочтения самок в тесте на выбор социально-значимого запаха, затрагивает аппетитивную фазу социального взаимодействия, а снижение времени контакта с самкой-интродером при отсутствии нарушений в ольфакторных тестах свидетельствует о сдвигах в консумматорной фазе социального взаимодействия (Рисунок 24). Можно предположить, что нарушения агрессивного и полового поведения на модели генетически обусловленного хронического воспаления происходят на уровне структур, которые регулируют консумматорную фазу и при этом содержат глициновые рецепторы (GlyR). GlyR присутствуют во многих структурах головного мозга, включая медиальное преоптическое ядро (MPN) гипоталамуса. MPN считается основным интегративным центром регуляции репродуктивного поведения у всех видов позвоночных [246] и является центральным ядром медиальной преоптической области (МПОА). Для нейронов МПОА, экспрессирующих эстрогеновый рецептор 1 (ESR1), характерны различные паттерны активности нейронов во время садок при наличии либо отсутствии ультразвуковых вокализаций. Оптогенетическая стимуляция нейронов МПОА, экспрессирующих ESR1 и везикулярный транспортер ГАМК, способствовала демонстрации самцами садок с наличием ультразвуковых вокализаций и приводила к тому, что атака, направленная на самца, преобразовывалась в садку. [238]. Таким образом, изменение содержания глицина, возможно, изменяет паттерн активности гипоталамических нейронов и реализуется в виде нарушений полового и агрессивного поведения.

Сдвиг предпочтения социально-значимого запаха на модели химически индуцированного хронического воспаления связан со снижением уровня триптофана в крови, и, предположительно происходит из-за нарушений в работе обонятельной системы. Самцы мышей с отсутствием триптофангидроксилазы-2 не проявляли предпочтения между запахами самцов и самок [268], но при этом демонстрировали садки на самцов, чего не наблюдалось у животных с химически индуцированным колитом (Рисунок 19 А). Инъекция 5-НТР нормализовала поведение самцов в тесте на предпочтение социально-значимого запаха (Рисунок 21 А), что подтверждает участие серотониновой системы в реализации наблюдаемого фенотипа. Серотонинергические волокна иннервируют гломерулярный слой обонятельной луковицы - первичный локус синаптической интеграции в обонятельной системе [296]. В литературе описана модель обонятельной бульбэктомии на мышах, связанная с серотонинергическими дисфункциями [297].

У мышей рецепция запаховых молекул в ходе взаимодействия с конспецификами происходит, главным образом, с помощью вомероназального органа. Животные с нокаутом в гене, кодирующем белок катионного канала TRP2, демонстрируют нарушения и в

[Введите текст]

запаховых предпочтениях, и во взаимодействии с интродером [298], чего не наблюдается у животных с химически индуцированным колитом в проведенном исследовании. Однако у мышей восприятие конспецификов обоих полов происходит и с участием основного обонятельного эпителия, а именно рецепторов следовых аминов TAAR5. В опубликованном исследовании чувствительность рецепторов TAAR5 к моче мышей того же пола, получавших диету без холина/метионина или проходивших курс антибиотиков в течение 1 недели, была снижена в 10 раз. Двухстадийный путь биосинтеза триметиламина включает синергию между комменсальной микрофлорой и печеночным ферментом, флавиносодержащей монооксигеназой 3 (FMO3), которая окисляет триметиламин [299]. Возможно, изменение состава кишечной микрофлоры вносит вклад в агрессивное и половое поведение самцов мышей с помощью влияния на рецепцию через TAAR5 рецепторы.

Кроме того, было показано, что TAAR5 экспрессируется не только в гломерулярном слое обонятельной луковицы, но и в более глубоких слоях, таких как переднее обонятельное ядро, обонятельный бугорок, орбитофронтальная кора, миндалина, гиппокамп, грушевидная кора, энторинальная кора, прилежащее ядро, а также ядра таламуса и гипоталамуса. У мышей с нокаутом гена, кодирующего белок TAAR5, не наблюдалось грубых аномалий развития, но в нескольких поведенческих тестах наблюдалось снижение тревожного и депрессивного поведения, а также было показано значительное снижение уровня серотонина и его метаболитов в тканях нескольких областей мозга. Эти наблюдения указывают на то, что TAAR5 не просто является обонятельным рецептором, но также служит для передачи обонятельной информации в лимбические области мозга и регулирует поведение, вероятно, посредством модуляции серотониновой системы [300].

Для обеих моделей ВЗК показано увеличение проницаемости кишки (Рисунок 1, 12), а для мышей с нокаутом в гене, кодирующем муцин-2, было показано увеличение проницаемости ГЭБ (Рисунок 9). Повышение проницаемости ГЭБ описано для мышей, полностью свободных от микробов [108], а также для DSS-индуцированного колита [301]. Проницаемость ГЭБ может быть одним из звеньев реализации связи “микробиота-кишечник-мозг” на двух исследованных моделях ВЗК.

Существенный вклад в различия двух поведенческих фенотипов, наблюдаемых на моделях ВЗК в данной работе, может вносить фактор продолжительности развития ВЗК. Вызванное хроническое воспаление развивалось в течение 6 недель суммарно, тогда как нокаут в гене, кодирующем муцин-2, изменяет состояние слизистой оболочки кишки уже у новорожденных животных. У нокаутов *Muc2*^{-/-} клинические признаки колита и

изменения в морфологии эпителия кишки появляются после отъема от гетерозиготной матери (с 21 дня) [302]. Изменения экспрессии генов антимикробных белков в толстой кишке у нокаутов *Muc2* детектируются уже на 14 день [303]. У людей ВЗК редко возникает в детском возрасте, и в таком случае часто имеет место моногенная ВЗК. У большинства пациентов ВЗК возникает в возрасте 20 лет и старше. Продолжительность развития основного заболевания, возможно, стоит учитывать в том числе и при коррекции коморбидных расстройств.

4.3.2. Сравнительный анализ запаховых и контактных тестов как инструментов поиска нейрональных механизмов социального поведения

Тест с двумя интродерами, который был использован в данной работе, основан на ранее опубликованных тестах на выбор партнера с изменениями [186], [268], [304], [305]. Например, Лейпольд и его коллеги использовали тест с двумя интродерами вместе с отдельными тестами резидент-интродер и тестом на выбор партнера, в которых использовали только одного интродера: самца либо самку. В этой работе была продемонстрирована ключевая роль вомероназального органа, и, в частности, катионного канала TRP2, в обработке запахового сигнала и специализации последующих поведенческих паттернов в зависимости от пола интродера [298]. Авторы определяют эту экспериментальную парадигму как «тест на выбор партнера для спаривания», поскольку она отражает более выраженное проявление полового поведения по отношению к самцам-интродерам у *Trp2*-мутантов. Аналогичным образом, Лью и соавторы также называют этот тест «тестом на выбор партнера для спаривания» и используют его для того, чтобы продемонстрировать половой интерес мышей с дефицитом серотонина при отсутствии предпочтения самок-интродеров у самцов [268]. Позже было показано, что садка на самца-интродера не обязательно отражает намерение полового поведения и соответствующую активацию нейронов, и может быть однозначно охарактеризована только по ультразвуковым вокализациям, сопровождающим садку [238]. Самцы мышей контрольной линии C57BL/6 в данном исследовании демонстрируют некоторое количество садок на самцов-интродеров, что вряд ли отражает половой интерес (Рисунок 23Г).

Тест с двумя интродерами позволяет наблюдать и измерять ряд поведенческих параметров, которые можно комбинировать для достижения конкретной цели исследования. Классический «тест на выбор партнера для спаривания», в основном, используется для оценки способности самцов различать самок и самцов-интродеров. Помимо спаривания и агрессии, которые позволяют четко дифференцировать социальное

[Введите текст]

поведение по отношению к самцу или самке (Рисунок 23 В,Г), в тесте с двумя интродерами было обнаружено, что аногенитальные обнюхивания являются ещё одной социальной активностью, которую следует учитывать при оценке фенотипов социального поведения у мышей. Анализ поведенческого паттерна в течение 15-минутного теста с двумя интродерами показал, что аногенитальное обнюхивание самки является преобладающей активностью самца-резидента. Это был единственный параметр, вносящий значительный вклад в социальную дискриминацию между самцами и самками-интродерами (Рисунок 23 Ж,З). Полученные данные согласуются с принятой в настоящее время концепцией выбора партнёра у мышей [306]. Согласно результатам проведенных экспериментов, аногенитальные обнюхивания можно рассматривать как ключевой показатель полового предпочтения.

Рецепция хемосигналов у мышей происходит с помощью обонятельного эпителия и вомероназального органа (Рисунок 25, [307]). Обонятельный эпителий МОЕ распознает небольшие летучие молекулы, а вомероназальный орган детектирует основные белки мочи и стероиды посредством тесного контакта с источником запаха [241]. Нейрональные контуры, участвующие в обработке феромональных сигналов, включают в себя дополнительную обонятельную луковицу (АОВ), медиальную амигдалу (MeA), основное ядро терминальной полоски (BNST), медиальную преоптическую область (mPOA), и вентромедиальный гипоталамус (VMH, Рисунок 25). Некоторые молекулы, которые важны как часть запахового стимула, животные могут воспринимать только при близком контакте. К примеру, основные белки в моче (MUPs) опосредуют агрессию между самцами исключительно через систему вомероназального органа. Для стимуляции самцовой агрессии и нейронов ВНО достаточно как минимум двух химически различных лигандов. Показано, что специфическая активность лиганда, стимулирующая агрессию, зависит от наличия белкового компонента основного комплекса белков мочи (MUP), который состоит из специализированных белков, связанных с малыми органическими молекулами [308]. Существенные различия в природе запахового стимула обуславливают характер активации клеток обонятельного тракта. Когда самцы мышей обнюхивали загрязненный подстил эстральных самок с возможностью физического контакта с образцом подстила, общее количество с-Fos-положительных клеток в зернистых клетках дополнительной обонятельной луковицы значительно увеличивалось, однако этот эффект не наблюдался при обнюхивании такого же образца подстила в отсутствие физического контакта с ним. Летучие компоненты запаха эстральной самки в отсутствие контакта с самкой также значительно увеличивали общее количество с-Fos-положительных клеток в каждом слое [Введите текст]

зернистых клеток АОВ. Предполагается, что эти летучие запаховые молекулы могут отсутствовать в загрязненном подстиле самок [309].

Специфика рецепции летучих и нелетучих ольфакторных стимулов описана и для самок мышей. В процессе распознавания партнера самкой нелетучие запахи распознаются в первую очередь вомероназальным органом, при этом летучие запахи, рецептируемые основной обонятельной системой, тоже важны для этого процесса [310]. Самки мышей проявляют половой интерес на физическое или воздушное воздействие мочи самцов, экстракта препуциальной железы и феромона альфа/бета-фарнезена, выделяемого препуциальной железой. Было установлено, что несколько химических веществ и белков служат аттрактантами для самок мышей, включая основной белок мочи дарцин, 3,4-дегидроэкто-бrevикомин и 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазол, смесь альфа- и бета-фарнезенов, а также гексадеканол и гексадецилацетат [311]. Дарцин вызывает сложный и изменчивый поведенческий репертуар у самок, включающий в себя интерес, ультразвуковую вокализацию и маркировку запахом мочи, а также служит подкреплением в парадигмах обучения. Показано, что оптическая активация дарцин-чувствительных нейронов в медиальной миндалине индуцирует как врожденное, так и обусловленное поведение, вызываемое феромоном. Медиальная амигдала (MeA) является важнейшим сегментом обонятельного контура, который контролирует как распознавание партнера, так и половое поведение у самок мышей [312].

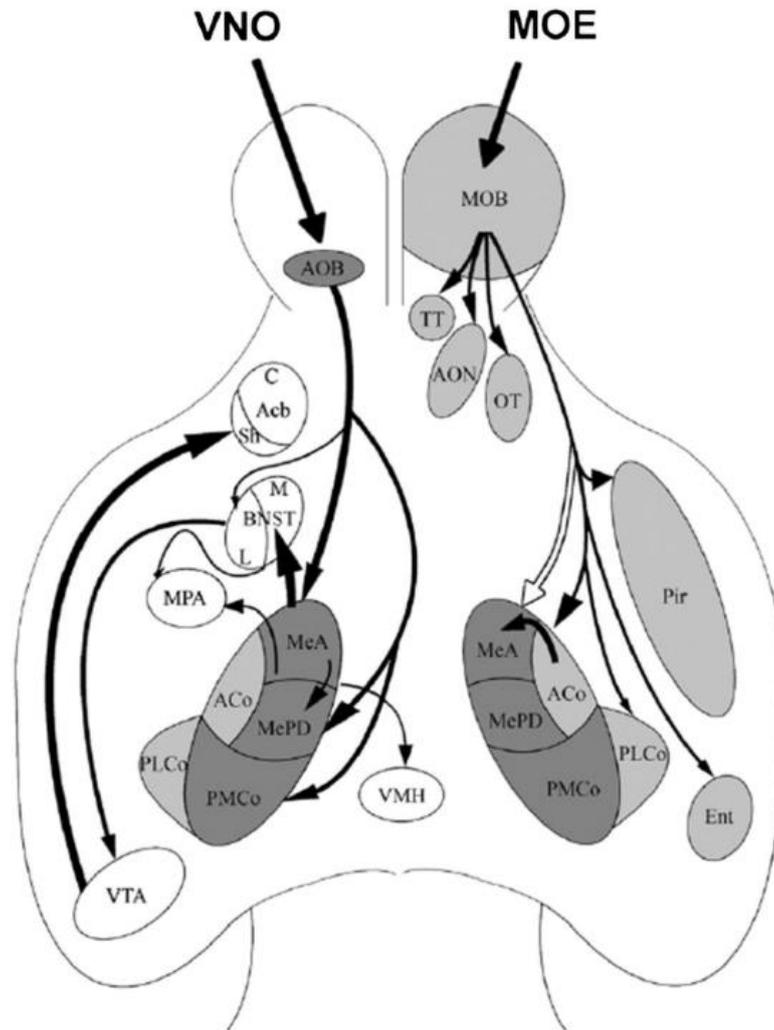


Рисунок 25. Схема проекций вомероназального органа (VNO; дополнительная обонятельная система) и основного обонятельного эпителия (МОЕ; основная обонятельная система) у мыши. Светло-серым цветом выделены области, которые получают прямой входной сигнал от основной обонятельной луковицы; темно-серым цветом выделены области, которые получают прямой входной сигнал от дополнительной обонятельной луковицы. Внутри миндалины светло-серые области обозначают «основную обонятельную» часть, а темно-серые – «вомероназальную». АОВ – дополнительная обонятельная луковица; MeA – передняя медиальная миндалина; MePD – заднедорсальная медиальная миндалина; PMCo – заднемедиальная корковая миндалина; ACo, передняя корковая миндалина; PLCo, заднелатеральная корковая миндалина; BNST, основное ядро терминальной полоски – латеральная (L) и медиальная (M) части; mPOA, медиальная преоптическая область; VMH, вентромедиальный гипоталамус; VTA, вентральная область покрышки; Ach, прилежащее ядро – ядро (C) и скорлупа (S); MOB, главная обонятельная

луковица; AON, переднее обонятельное ядро; OT, ядро обонятельного тракта; Pir, грушевидная кора; Ent, энторинальная кора. [306]

Таким образом, специфика запахового стимула, предъявляемого в ходе ольфакторного теста, вносит существенный вклад в активацию групп нейронов и последующую поведенческую реакцию исследуемого животного. Необходимо учитывать особенности использования запаховых стимулов (загрязненный подстил, моча, мазки, секрет желез либо предоставление интродера без зрительного и тактильного контакта) для интерпретации результатов исследования. Взаимодействие животных в тесте с двумя интродерами состоит из многих компонентов, однако, основной вклад во взаимодействие самца и интродера вносят аногенитальные обнюхивания. Тем не менее, было показано, что результаты теста с предоставлением запахов не отражают полную картину результатов при взаимодействии самих животных. Корреляции времени обнюхивания самки в тесте на предпочтение социально-значимого запаха и в тесте с двумя интродерами обнаружено не было ($r = 0,12$, Рисунок 23 И).

Реакция используемых интродеров на животное-резидента тоже вносит вклад в результат теста с интродером, поэтому для получения более полной информации оптимально проводить и другие тесты в парадигме «резидент-интродер». Так, например, показано, что для проявления агрессивного поведения визуальное присутствие атакуемого объекта должно быть интегрировано с запаховыми и феромональными сигналами [313]. Важно отметить, что реакция исследуемого животного в тесте с интродером может изменяться в зависимости от его собственного статуса и опыта. Показано, что предпочтение социальных запахов меняется у самцов мышей с получением полового опыта [157]. Влияние социального контакта с самцом (обнюхивание и облизывание, но без получения полового опыта) на предпочтение социального запаха показано и для самок [314]. Таким образом, тесты для оценки особенностей социального поведения животных с использованием интродеров целесообразно комбинировать с тестами на предпочтение запахов в зависимости от цели исследования. Тесты на предпочтение социально-значимого запаха, как правило, характеризуют appetitive фазу социальной коммуникации [157], в то время как тест с двумя интродерами в значительной степени отражает consummatory фазу социального взаимодействия. Следовательно, комбинация этих двух тестов является мощным инструментом для оценки изменений в нейронных контурах, регулирующих социальную коммуникацию.

[Введите текст]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Самцы мышей с нокаутом в гене *Muc2* демонстрируют различия в морфологии кишки, составе кишечной микробиоты, проницаемости кишки и социальных взаимодействиях по сравнению с самцами мышей линии C57BL/6. Полученные данные указывают на то, что именно сдвиги состава кишечной микробиоты приводят к изменению социального поведения у самцов мышей. Модель DSS-индуцированного колита подтверждает возможность появления нарушений социального поведения после индукции острого и хронического колита, однако характер этих изменений отличается от наблюдаемых нарушений поведения у самцов с нокаутом в гене, кодирующем белок муцин-2. Возможность модулировать поведение животных через предоставление L-фукозы подтверждает, что в основе поведенческих изменений у мышей с химически-индуцированным колитом лежит изменение состава кишечной микробиоты.

ВЫВОДЫ

1. Самцы мышей с хроническим колитом, обусловленным нокаутом гена, кодирующего муцин-2, и их однопометники без мутации характеризуются снижением тревожного и стереотипного поведения, нарушениями социального поведения, и повышением уровня глицина в головном мозге по сравнению с контрольной линией C57BL/6.

2. Самцы мышей с хроническим колитом, обусловленным нокаутом гена, кодирующего муцин-2, характеризуются усилением активации нейронов вентромедиального гипоталамуса при контакте с самцом в сравнении с контрольной линией C57BL/6.

3. У самцов мышей с хроническим колитом, обусловленным нокаутом гена, кодирующего муцин-2, нарушена целостность кишечного и гематоэнцефалического барьеров в сравнении с контрольной линией C57BL/6.

4. Нарушения поведения самцов мышей с хроническим колитом, обусловленным нокаутом гена, кодирующего муцин-2, и их однопометников без мутации ассоциированы с изменением кишечной микробиоты.

5. Самцы мышей с хроническим колитом, индуцированным потреблением натриевой соли сульфата декстрана, характеризуются нарушениями предпочтения запаха самки и снижением уровня триптофана в крови.

6. Нарушения предпочтения запаха самки у самцов мышей с хроническим колитом, индуцированным потреблением натриевой соли сульфата декстрана, ассоциированы со снижением уровня триптофан-продуцирующих бактерий в составе кишечной микробиоты.

7. Фукоза восстанавливает уровень триптофан-продуцирующих бактерий *Escherichia coli* в кишечнике, триптофана в крови и предпочтение запаха самки у самцов мышей с хроническим колитом, индуцированным потреблением натриевой соли сульфата декстрана.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- ЦНС – центральная нервная система
- DSS – dextran sulfate sodium salt (натриевая соль сульфата декстрана, ДСС).
- ГЭБ – гемато-энцефалический барьер
- SPF – specified pathogen free, свободные от специфических патогенов
- GF – germ free, свободные от микробов
- BDNF – brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор мозга
- 4-EPS – 4-ethylphenylsulfate, 4-этилфенилсульфат
- КЖК – короткоцепочечные жирные кислоты
- ГГН – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая (ось)
- ВЗК – воспалительные заболевания кишечника
- ЯК – язвенный колит
- БК – болезнь Крона
- FELASA – federation for laboratory animal science associations
- ШИК – Шифф-йодная кислота
- ЦКП – центр коллективного пользования
- БК – бокаловидные клетки
- ПМЯк – полиморфоядерные клетки
- ВМГ (VMH) – вентромедиальный гипоталамус (ventromedial hypothalamus)
- PBS – phosphate buffer saline, фосфатный буфер
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- БК – бокаловидные клетки
- ЯМР-спектроскопия – спектроскопия ядерного магнитного резонанса
- TNF – tumor necrosis factor, фактор некроза опухолей
- IL – interleukin (интерлейкин)
- TGF – transforming growth factor, трансформирующий фактор роста
- COX-1 – cyclooxygenase, циклооксигеназа
- ZO – zonula occludens, плотные контакты
- FITC – fluorescein isothiocyanate, флуоресцеин изотиоцианат.
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

ПК – плотные контакты
АК – адгезивные контакты
АМК – амоксициллин с клавулановой кислотой
IDO1 – индоламин-2,3-диоксигеназа
РАС – расстройства аутистического спектра
СИОЗС – селективные ингибиторы обратного захвата серотонина
DRN – дорсальное ядро шва
MRN – срединное ядро шва
АОВ – дополнительная обонятельная луковица
АОВа – передняя дополнительная обонятельная луковица
АОВр – задняя дополнительная обонятельная луковица
BNSTpl/pm – заднелатеральное/заднемедиальное ядро ложа терминальной полоски
COApl/pm – заднелатеральное/заднемедиальное корковая амигдала
CTF – центральное поле покрышки
MDRN – ретикулярное ядро продолговатого мозга
МЕА – медиальная амигдала
МОВ – главная обонятельная луковица
МРА – медиальная преоптическая область
NAc – прилежащее ядро
NRM – большое ядро шва
NRP – бледное ядро шва
PAG – околowodопроводное серое вещество
PnC – каудальная часть моста
SI – безымьянная субстанция
VTA – вентральная область покрышки.
MOS – основная обонятельная система
AOS – дополнительная обонятельная система
PAG – околowodопроводное серое вещество
МПО – медиальное преоптическое ядро
5-HIAA – 5-гидроксииндолилуксусная кислота
GlyR – глициновый рецептор
ГАМК – гаммааминомасляная кислота
ESR1 – эстрогеновый рецептор 1
VNO – вомероназальный орган

MOE – основной обонятельный эпителий
MePD – заднедорсальная медиальная миндалина
PMCo – заднемедиальная корковая миндалина
ACo – передняя корковая миндалина
PLCo – заднелатеральная корковая миндалина
Ach – прилежащее ядро
AON – переднее обонятельное ядро
OT – ядро обонятельного тракта
Pir – грушевидная кора
Ent – энторинальная кора
MUPs – основные белки в моче
FMO3 – флавиносодержащая монооксигеназа 3

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baumgart D. C., Sandborn W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60751-X.
2. Korzenik J. R. Past and Current Theories of Etiology of IBD. *J Clin Gastroenterol*, 2005, vol. 39, no. 4, pp. S59–S65, doi: 10.1097/01.mcg.0000155553.28348.fc.
3. Neuman M. G., Nanau R. M. Inflammatory bowel disease: Role of diet, microbiota, life style. 2012, Mosby Inc. doi: 10.1016/j.trsl.2011.09.001.
4. MacDonald T. T., Monteleone I., Fantini M. C., Monteleone G. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology*, 2011, vol. 140, no. 6, pp. 1768–1775, doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.047.
5. Neuendorf R., Harding A., Stello N., Hanes D., Wahbeh H. Depression and anxiety in patients with Inflammatory Bowel Disease: A systematic review. Elsevier Inc. 2016, doi: 10.1016/j.jpsychores.2016.06.001.
6. Conley S., Jeon S., Lehner V., Proctor D. D., Redeker N. S. Sleep Characteristics and Rest–Activity Rhythms Are Associated with Gastrointestinal Symptoms Among Adults with Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci*, 2021, vol. 66, no. 1, pp. 181–189, doi: 10.1007/s10620-020-06213-6.
7. Massironi S. et al. The Burden of Psychiatric Manifestations in Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review With Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*, 2025, vol. 31, no. 5, pp. 1441–1459, doi: 10.1093/ibd/izae206.
8. Filipovic B. R., Filipovic B. F. Psychiatric comorbidity in the treatment of patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2014, vol. 20, no. 13, pp. 3552–3563, doi: 10.3748/wjg.v20.i13.3552.
9. Kok K. B., Byrne P., Ibarra A. R., Martin P., Rampton D. S. Understanding and managing psychological disorders in patients with inflammatory bowel disease: A practical guide. *Frontline Gastroenterol*, 2022, vol. 14, no. 1, pp. 78–86, , doi: 10.1136/flgastro-2022-102094.
10. Van Klinken B. J. W., Van Der Wal J. W. G., Einerhand A., Büller H. A., Dekker J. Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut*, 1999, vol. 44, no. 3, pp. 387–393, doi: 10.1136/gut.44.3.387.
11. Johansson M. E. V., Phillipson M., Petersson J., Velcich A., Holm L., Hansson G. C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, vol. 105, no. 39, pp. 15064–15069, doi: 10.1073/pnas.0803124105.

12. Van der Sluis M. et al. Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology*, 2006, vol. 131, no. 1, pp. 117–129, doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>.
13. Barnett JA, Josephson JK, Yuzbashian E, et al. Prenatal exposure to dietary levels of glyphosate disrupts metabolic, immune, and behavioral markers across generations in mice. *Sci Total Environ*. 2025. vol. 1002, 180437. doi:10.1016/j.scitotenv.2025.180437
14. Kiesler P., Fuss I. J., Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2015, vol. 1, no. 2, pp. 154–170, doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.01.006.
15. Hassan A. M. et al. Repeated predictable stress causes resilience against colitis-induced behavioral changes in mice. *Front Behav Neurosci*, 2014, vol. 8, p. 386, doi: 10.3389/fnbeh.2014.00386.
16. Reichmann F., Hassan A. M., Farzi A., Jain P., Schuligoi R., Holzer P. Dextran sulfate sodium-induced colitis alters stress-associated behaviour and neuropeptide gene expression in the amygdala-hippocampus network of mice. *Sci Rep*, 2015, vol. 5, p. 9970, doi: 10.1038/srep09970.
17. Bercik P. et al. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterology and Motility*, 2011, vol. 23, no. 12, pp. 1132–1139, doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01796.x.
18. Kostic A. D., Xavier R. J., Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: Current status and the future ahead. *Gastroenterology*, 2014, vol. 146, no. 6, pp. 1489–1499, doi: 10.1053/j.gastro.2014.02.009.
19. Cho I., Blaser M. J. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nature reviews. Genetics*, 2012. vol. 13, no. 4, 260–270. doi: 10.1038/nrg3182.
20. Forsythe P., Sudo N., Dinan T., Taylor V. H., Bienenstock J. Mood and gut feelings. *Brain Behav Immun*, 2010, vol. 24, no. 1, pp. 9–16, doi: 10.1016/j.bbi.2009.05.058.
21. Thomann A. K. et al. Review article: bugs, inflammation and mood—a microbiota-based approach to psychiatric symptoms in inflammatory bowel diseases. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2020 vol. 52, no. 2, 247–266., doi: 10.1111/apt.15787.
22. Moulton C. D. et al.. Depressive symptoms in inflammatory bowel disease: an extraintestinal manifestation of inflammation? *Clin Exp Immunol*, 2019, vol. 197, no. 3, pp. 308–318, doi: 10.1111/cei.13276.

23. Bercik P. et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology*, 2011, vol. 141, no. 2, pp. 599-609.e3, doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.052.
24. Selkig J., Wong P., Zhang X., Pettersson S. Metabolic tinkering by the gut microbiome: Implications for brain development and function. *Gut microbes*, 2014, vol. 5, no. 3, 369–380. doi: 10.4161/gmic.28681.
25. Desbonnet L., Garrett L., Clarke G., Kiely B., Cryan J. F., Dinan T. G. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*, 2010, vol. 170, no. 4, pp. 1179–1188, doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.08.005.
26. Bravo J. A. et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, vol. 108, no. 38, pp. 16050–5, doi: 10.1073/pnas.1102999108.
27. Savignac H. M., Tramullas M., Kiely B., Dinan T. G., Cryan J. F. *Bifidobacteria* modulate cognitive processes in an anxious mouse strain. *Behavioural Brain Research*, 2015, vol. 287, pp. 59–72, doi: 10.1016/j.bbr.2015.02.044.
28. Hsiao E. Y. et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 2013, vol. 155, no. 7, pp. 1451–1463, doi: 10.1016/j.cell.2013.11.024.
29. Sudo N. et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*, 2004, vol. 558, no. Pt 1, pp. 263–75, doi: 10.1113/jphysiol.2004.063388.
30. Ordás I., Eckmann L., Talamini M., Baumgart D. C., Sandborn W. J. Ulcerative colitis. *Lancet*, 2012, vol. 380, no. 9853, pp. 1606–1619. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60150-0.
31. Xavier R. J., Podolsky D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007, doi: 10.1038/nature06005.
32. Shapiro J. M., Subedi S., LeLeiko N. S. Inflammatory bowel disease. *Pediatrics in Review*, 2016, vol. 37, no. 8, 337-405, doi: 10.1542/pir.2015-0110.
33. Mizoguchi E., Subramaniam R., Okada T., Mizoguchi A. A Review of Selected IBD Biomarkers: From Animal Models to Bedside. *Diagnostics*, 2021, vol. 11, no. 2, p. 207, doi: 10.3390/diagnostics11020207.
34. Князев О.В., Шкурко Т.В., Каграманова А.В., Веселов А.В., Никонов Е.Л. Эпидемиология воспалительных заболеваний кишечника. Современное состояние проблемы (обзор литературы). *Доказательная гастроэнтерология*. 2020;9(2):66-73.

35. Malik T. A. Inflammatory Bowel Disease. Historical Perspective, Epidemiology, and Risk Factors. *Surg Clin North Am.* 2015, vol. 95, no. 6.1105-v. doi: 10.1016/j.suc.2015.07.006.
36. Shim J. O. Recent advance in very early onset inflammatory bowel disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2019, doi: 10.5223/pghn.2019.22.1.41.
37. Strober W., Fuss I., Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, vol. 117, no. 3, pp. 514–21, doi: 10.1172/JCI30587.514.
38. Ho S. M. et al. Challenges in IBD Research: Environmental Triggers. *Inflamm Bowel Dis.* 2019, vol. 25(Suppl 2) pp. S13-S23. doi: 10.1093/ibd/izz076.
39. Hudson L. E., Anderson S. E., Corbett A. H., Lamb T. J. Gleaning insights from fecal microbiota transplantation and probiotic studies for the rational design of combination microbial therapies. *Clin Microbiol Rev.* 2017; vol. 30, no. 1, 191-231. doi: 10.1128/CMR.00049-16.
40. Leone V., Chang E. B., Devkota S. Diet, microbes, and host genetics: The perfect storm in inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol.* 2013, vol. 48, no. 3, pp. 315-321. doi: 10.1007/s00535-013-0777-2.
41. Ananthakrishnan A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, vol. 12, no. 4, pp. 205–217, doi: 10.1038/nrgastro.2015.34.
42. Flynn S., Eisenstein S. Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. *Surg Clin North Am.* 2019, vol. 99, no. 6, pp. 1051-1062. doi: 10.1016/j.suc.2019.08.001.
43. Orholm M., Munkholm P., Langholz E., Nielsen O. H., Sørensen T. I. a., Binder V. Familial Occurrence of Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine*, 1991, vol. 324, no. 2, pp. 84–88, doi: 10.1056/NEJM199101103240203.
44. Krawiec P., Pawłowska-Kamieniak A., Pac-Kożuchowska E. Interleukin 10 and interleukin 10 receptor in paediatric inflammatory bowel disease: from bench to bedside lesson. *J Inflamm (Lond).* 2021, vol. 18, no. 1, pp.13. doi: 10.1186/s12950-021-00279-3.
45. Nambu R. et al. A Systematic Review of Monogenic Inflammatory Bowel Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2022, vol. 20, no. 4, pp. e653-e663. doi: 10.1016/j.cgh.2021.03.021.
46. Fernández-Tomé S., Moreno L. O., Chaparro M., Gisbert J. P. Gut microbiota and dietary factors as modulators of the mucus layer in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Sci.* 2021, vol. 22, no. 19, pp. 10224. doi: 10.3390/ijms221910224.

47. Zheng D., Liwinski T., Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res*, 2020, vol. 30, no. 6, pp. 492–506, doi: 10.1038/S41422-020-0332-7.
48. Lin L., Zhang J. Role of intestinal microbiota metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol*, 2017, vol. 18, no. 1, doi: 10.1186/S12865-016-0187-3.
49. Negi S., Saini S., Tandel N., Sahu K., Mishra R. P. N., Tyagi R. K. Translating treg therapy for inflammatory bowel disease in humanized mice. *Cells*. 2021, vol. 10, no. 8, pp. 1847. doi: 10.3390/cells10081847.
50. Sartor R. B. Mechanisms of disease: Pathogenesis of Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2006, vol. 3, no. 7, pp. 390–407, doi: 10.1038/ncpgasthep0528.
51. Wallace K. L., Zheng L. B., Kanazawa Y., Shih D. Q. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2014, vol. 20, no. 1, pp. 6–21, doi: 10.3748/wjg.v20.i1.6.
52. Lee S. H., Kwon J., Cho M. La. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res*. 2018, vol.16, no. 1, pp. 26-42. doi: 10.5217/ir.2018.16.1.26.
53. Aldars-garcía L., Marin A. C., Chaparro M., Gisbert J. P. The interplay between immune system and microbiota in inflammatory bowel disease: A narrative review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. № 6. P. 3076. doi: 10.3390/ijms22063076.
54. Martinez K. B., Leone V., Chang E. B. Microbial metabolites in health and disease: Navigating the unknown in search of function. *J Biol Chem*, 2017. vol. 292. no 21. 8553–8559. doi: 10.1074/jbc.R116.752899.
55. Qin J. et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, vol. 464, no. 7285, pp. 59–65, doi: 10.1038/nature08821.
56. Bilotta A. J., Cong Y. Gut microbiota metabolite regulation of host defenses at mucosal surfaces: implication in precision medicine. *Precis Clin Med*, 2019, vol. 2, no. 2, pp. 110–119, doi: 10.1093/PCMED/PBZ008.
57. Salvi P. S., Cowles R. A. Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 7, p. 1775, doi: 10.3390/cells10071775.
58. Nishida A., Inoue R., Inatomi O., Bamba S., Naito Y., Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol*. 2018, vol. 11, no. 1, pp. 1-10 doi: 10.1007/s12328-017-0813-5.

59. Mondot S., Lepage P. The human gut microbiome and its dysfunctions through the meta-omics prism. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, vol. 1372, no. 1, pp. 9–19, doi: 10.1111/nyas.13033.
60. Atarashi K. et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*, 2011, vol. 331, no. 6015, pp. 337–341, doi: 10.1126/SCIENCE.1198469.
61. Sartor R. B. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 2008, vol. 134, no. 2, pp. 577–594, doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.059.
62. Rowan F., Docherty N. G., Murphy M., Murphy B., Coffey J. C., O’Connell P. R. *Desulfovibrio* bacterial species are increased in ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum*, 2010, vol. 53, no. 11, pp. 1530–1536, doi: 10.1007/DCR.0B013E3181F1E620.
63. Png C. W. et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *American Journal of Gastroenterology*, 2010, vol. 105, no. 11, pp. 2420–2428, doi: 10.1038/ajg.2010.281.
64. Torres J. et al. Infants born to mothers with IBD present with altered gut microbiome that transfers abnormalities of the adaptive immune system to germ-free mice. *Gut*, 2020, vol. 69, no. 1, pp. 42–51, doi: 10.1136/gutjnl-2018-317855.
65. Schaubeck M. et al. Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn’s disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut*, 2016, vol. 65, no. 2, pp. 225–237, doi: 10.1136/GUTJNL-2015-309333.
66. Britton G. J. et al. Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR γ t + Regulatory T Cells and Exacerbate Colitis in Mice. *Immunity*, 2019, vol. 50, no. 1, pp. 212–224.e4, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2018.12.015.
67. Michielan A., D’Inca R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm.* 2015; 628157. doi: 10.1155/2015/628157.
68. Ivanov A. I., Parkos C. A., Nusrat A. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *Am J Pathol.* 2010, vol. 177, no. 2, pp. 512–524. doi: 10.2353/ajpath.2010.100168.
69. Antoni L., Nuding S., Wehkamp J., Stange E. F. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2014, vol. 20, no. 5, pp. 1165–1179, doi: 10.3748/wjg.v20.i5.1165.
70. Vivinus-Nébot M. et al. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: Role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut*, 2014, vol. 63, no. 5, pp. 744–752, doi: 10.1136/gutjnl-2012-304066.

71. Buhner S. et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: Role of CARD15 3020insC mutation?. *Gut*, 2006, vol. 55, no. 3, pp. 342–347, doi: 10.1136/gut.2005.065557.
72. Fries W. et al. Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of crohn's disease in Southern Italy. *American Journal of Gastroenterology*, 2005, vol. 100, no. 12, pp. 2730–2736, doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.00325.x.
73. Irvine E. J., Marshall J. K. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology*, 2000, vol. 119, no. 6, pp. 1740–1744, doi: 10.1053/gast.2000.20231.
74. Vindigni S. M., Zisman T. L., Suskind D. L., Damman C. J. The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: A tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions. *Therap Adv Gastroenterol*. 2016, vol. 9, no. 4, pp. 606-625. doi: 10.1177/1756283X16644242.
75. Wehkamp J. et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2003, vol. 9, no. 4, pp. 215–223, doi: 10.1097/00054725-200307000-00001.
76. Boltin D., Perets T. T., Vilkin A., Niv Y. Mucin function in inflammatory bowel disease: An update. *J Clin Gastroenterol*, 2013, vol. 47, no. 2, pp. 106–111, doi: 10.1097/MCG.0b013e3182688e73.
77. Heazlewood C. K. et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med*, 2008, vol. 5, no. 3, pp. 0440–0460, doi: 10.1371/journal.pmed.0050054.
78. Ahmad R., Sorrell M. F., Batra S. K., Dhawan P., Singh A. B. Gut permeability and mucosal inflammation: Bad, good or context dependent. *Mucosal Immunol*. 2017, vol. 10, no. 2, pp. 307-317. doi: 10.1038/mi.2016.128.
79. Bruewer M., Samarin S., Nusrat A. Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex. *Ann N Y Acad Sci*. 2006, vol. 1072, pp. 242-252. doi: 10.1196/annals.1326.017.
80. Zeissig S. et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, 2007, vol. 56, no. 1, pp. 61–72, doi: 10.1136/gut.2006.094375.

81. Hering N. A., Fromm M., Schulzke J.-D. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J Physiol*, 2012, vol. 590, no. 5, pp. 1035–1044, doi: 10.1113/jphysiol.2011.224568.
82. O’Hara J. R., Buret A. G. Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. *Frontiers in Bioscience*, 2008, vol. 13, no. 18, pp. 7008–7021, doi: 10.2741/3206.
83. Bergstrom K. S. B. et al. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog*, 2010, vol. 6, no. 5, doi: 10.1371/journal.ppat.1000902.
84. Kisson-Singh V., Moreau F., Trusevych E., Chadee K. *Entamoeba histolytica* exacerbates epithelial tight junction permeability and proinflammatory responses in Muc2(-/-) mice. *Am J Pathol*, 2013, vol. 182, no. 3, pp. 852–65, doi: 10.1016/j.ajpath.2012.11.035.
85. Iliopoulou L., Kollias G. Harnessing murine models of Crohn’s disease ileitis to advance concepts of pathophysiology and treatment. *Mucosal Immunol*, 2022, vol. 15, no. 1, pp. 10-26. doi: 10.1038/s41385-021-00433-3.
86. Kaur M., Dalal R. L., Shaffer S., Schwartz D. A., Rubin D. T. Inpatient Management of Inflammatory Bowel Disease-Related Complications. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020, vol. 18, no. 6, pp. 1346-1355. doi: 10.1016/j.cgh.2019.12.040.
87. Gisbert J. P., Chaparro M. Predictors of Primary Response to Biologic Treatment Anti-TNF, Vedolizumab, and Ustekinumab in Patients with Inflammatory Bowel Disease: From Basic Science to Clinical Practice. *J Crohns Colitis*. 2020, vol. 14, no. 5, pp. 694-709. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz195.
88. McLean M. H., Neurath M. F., Durum S. K. Targeting interleukins for the treatment of inflammatory bowel disease - What lies beyond anti-TNF therapy? *Inflamm Bowel Dis*. 2014, vol. 20, no. 2, pp. 389-397. doi: 10.1097/01.MIB.0000437616.37000.41.
89. Binienda A., Fichna J., Salaga M. Recent advances in inflammatory bowel disease therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, vol. 155, p. 105550, doi: 10.1016/j.ejps.2020.105550.
90. Bejaoui M., Sokol H., Marteau P. Targeting the Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Critical Evaluation of Current Concepts and Moving to New Horizons. *Digestive Diseases*, 2015, vol. 33, no. suppl 1, pp. 105–112, doi: 10.1159/000437104.
91. Khan K. J. et al. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 2011, vol. 106, no. 4, pp. 661–673, doi: 10.1038/ajg.2011.72.

92. Akutko K., Stawarski A. Probiotics, prebiotics and synbiotics in inflammatory bowel diseases. *J Clin Med*. 2021, vol. 10, no. 11, p. 2466. doi: 10.3390/jcm10112466.
93. Borody T. J., Warren E. F., Leis S., Surace R., Ashman O. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol*, 2003, vol. 37, no. 1, pp. 42–47, doi: 10.1097/00004836-200307000-00012.
94. Angelberger S. et al. Temporal bacterial community dynamics vary among ulcerative colitis patients after fecal microbiota transplantation. *American Journal of Gastroenterology*, 2013, vol. 108, no. 10, pp. 1620–1630, doi: 10.1038/ajg.2013.257.
95. Ott C. Scholmerich J. Extraintestinal manifestations and complications in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, vol. 10, no. 10, pp. 585–595, doi: 10.1038/nrgastro.2013.117.
96. Ferro J. M., Oliveira Santos M. Neurology of inflammatory bowel disease. *J Neurol Sci*. 2021, vol. 424, 117426. doi: 10.1016/j.jns.2021.117426.
97. Argollo M., Gilardi D., Peyrin-Biroulet C., Chabot J. F., Peyrin-Biroulet L., Danese S. Comorbidities in inflammatory bowel disease: a call for action. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, vol. 4, no. 8, pp. 643–654, doi: 10.1016/S2468-1253(19)30173-6.
98. Günther C., Rothhammer V., Karow M., Neurath M., Winner B. The Gut-Brain Axis in Inflammatory Bowel Disease-Current and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*, 2021, vol. 22, no. 16, doi: 10.3390/IJMS22168870.
99. Powles W. E. Ulcerative colitis - Criteria of a 'Psychosomatic' Disease. *The canadian psychiatric journal*, 1964. vol. 9, no. 1, pp. 51–56.
100. Clarke D. M., Currie K. C. Depression, anxiety and their relationship with chronic diseases: A review of the epidemiology, risk and treatment evidence. *Med J Aust*. 2009, vol. 190, no. S7, pp. S54-S60. doi: 10.5694/j.1326-5377.2009.tb02471.x.
101. Lewis K. et al. The Prevalence and Risk Factors of Undiagnosed Depression and Anxiety Disorders among Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, vol. 25, no. 10, pp. 1674–1680, doi: 10.1093/ibd/izz045.
102. Ancona A. et al.. The gut–brain axis in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease*, 2021, vol. 53, no. 3, pp. 298–305, doi: 10.1016/j.dld.2020.11.026.
103. Maes M., Kubera M., Leunis J.-C. The gut-brain barrier in major depression: Intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008, vol. 29, no. 1, pp. 117-124.

104. Regueiro M., Greer J. B., Szigethy E. Etiology and Treatment of Pain and Psychosocial Issues in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 2017, vol. 152, no. 2, pp. 430-439.e4, doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.036.
105. Powell N., Walker M. M., Talley N. J. The mucosal immune system: Master regulator of bidirectional gut-brain communications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017, vol. 14, no. 3, pp. 143-159 doi: 10.1038/nrgastro.2016.191.
106. Vitkovic L., Konsman J. P., Bockaert J., Dantzer R., Homburger V., Jacque C. Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry*, 2000, vol. 5, no. 6, pp. 604–615, doi: 10.1038/sj.mp.4000813.
107. Yuan N., Chen Y., Xia Y., Dai J., Liu C. Inflammation-related biomarkers in major psychiatric disorders: a cross-disorder assessment of reproducibility and specificity in 43 meta-analyses. *Transl Psychiatry*, 2019, vol. 9, no. 1, doi: 10.1038/S41398-019-0570-Y.
108. Braniste V. et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med*, 2014, vol. 6, no. 263, doi: 10.1126/scitranslmed.3009759.
109. Sampson T. R. et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson’s Disease. *Cell*, 2016, vol. 167, no. 6, pp. 1469-1480.e12, doi: 10.1016/j.cell.2016.11.018.
110. Dantzer R., O’Connor J. C., Freund G. G., Johnson R. W., Kelley K. W. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, 2008, vol. 9, no. 1, pp. 46–56, doi: 10.1038/nrn2297.
111. Erny D. et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*, 2015, vol. 18, no. 7, pp. 965–977, doi: 10.1038/NN.4030.
112. Luck B. et al. Bifidobacteria shape host neural circuits during postnatal development by promoting synapse formation and microglial function. *Sci Rep*, 2020, vol. 10, no. 1, doi: 10.1038/S41598-020-64173-3.
113. Morais L. H., Schreiber H. L., Mazmanian S. K. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol*, 2021, vol. 19, no. 4, pp. 241–255, doi: 10.1038/s41579-020-00460-0.
114. Yissachar N. et al. An Intestinal Organ Culture System Uncovers a Role for the Nervous System in Microbe-Immune Crosstalk. *Cell*, 2017, vol. 168, no. 6, pp. 1135-1148.e12, doi: 10.1016/J.CELL.2017.02.009.
115. Matheoud D. et al. Intestinal infection triggers Parkinson’s disease-like symptoms in *Pink1* $-/-$ mice. *Nature*, 2019, vol. 571, no. 7766, pp. 565–569, doi: 10.1038/s41586-019-1405-y.

116. Yano J. M., Hsiao E. Y. A Role for the Microbiota in Neurodevelopmental Disorders. *The Gut-Brain Axis*, Academic Press, 2016, Pages 305-318, doi: 10.1016/B978-0-12-802304-4.00014-1.
117. Dalile B., Van Oudenhove L., Vervliet B., Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019, vol. 16, no. 8, pp. 461-478. doi: 10.1038/s41575-019-0157-3.
118. Marchesi J. R. et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res*, 2007, vol. 6, no. 2, pp. 546–551, doi: 10.1021/PR060470D.
119. Rothhammer V. et al. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med*, 2016, vol. 22, no. 6, pp. 586–597, doi: 10.1038/NM.4106.
120. Di Giovangiulio M., Verheijden S., Bosmans G., Stakenborg N., Boeckxstaens G. E., Matteoli G. The Neuromodulation of the Intestinal Immune System and Its Relevance in Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*, 2015, vol. 6, doi: 10.3389/FIMMU.2015.00590.
121. Engel M. A., Becker C., Reeh P. W., Neurath M. F. Role of sensory neurons in colitis: Increasing evidence for a neuroimmune link in the gut. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, vol. 17, no. 4, pp. 1030–1033, doi: 10.1002/ibd.21422.
122. Fülling C., Dinan T. G., Cryan. J. F. Gut Microbe to Brain Signaling: What Happens in Vagus. *Neuron*, 2019, vol. 101, no. 6, pp. 998–1002, doi: 10.1016/J.NEURON.2019.02.008.
123. Sgritta M. et al.. Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron*, 2019, vol. 101, no. 2, pp. 246-259.e6, doi: 10.1016/j.neuron.2018.11.018.
124. Bonaz B., Picq C., Sinniger V., Mayol J. F., Clarençon D. Vagus nerve stimulation: From epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Neurogastroenterology and Motility*, 2013, vol. 25, no. 3, pp. 208–221, doi: 10.1111/nmo.12076.
125. Goehler L. E. et al. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *J Neurosci*, 1999, vol. 19, no. 7, pp. 2799–2806, doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-07-02799.1999.
126. Cryan J. F., Dinan T. G. Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*, 2012, vol. 13, no. 10, pp. 701–712, doi: 10.1038/nrn3346.

127. Clarke G., Stilling R. M., Kennedy P. J., Stanton C., Cryan J. F., Dinan T. G. Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol.* 2014, vol. 28, no. 8, pp. 1221-1238 doi: 10.1210/me.2014-1108.
128. Yano J. M. et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*, 2015, vol. 161, no. 2, pp. 264–276, doi: 10.1016/j.cell.2015.02.047.
129. Heijtz R. D. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, vol. 108, no. 7, pp. 3047–3052, doi: 10.1073/pnas.1010529108.
130. Neufeld K. M., Kang N., Bienenstock J., Foster J. A. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and Motility*, 2011, vol. 23, no. 3, pp. 255–265, doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x.
131. Zheng P. et al. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Mol Psychiatry*, 2016, vol. 21, no. 6, pp. 786–796, doi: 10.1038/mp.2016.44.
132. Luczynski P. et al. Adult microbiota-deficient mice have distinct dendritic morphological changes: differential effects in the amygdala and hippocampus. *Eur J Neurosci*, 2016, vol. 44, no. 9, pp. 2654–2666, doi: 10.1111/EJN.13291.
133. Hoban A. E. et al. Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. *Transl Psychiatry*, 2016, vol. 6, no. 4, doi: 10.1038/TP.2016.42.
134. Mizoguchi A., Takeuchi, T. Himuro H., Okada T., Mizoguchi E. Genetically engineered mouse models for studying inflammatory bowel disease. *J Pathol.* 2016, vol. 238, no. 2, pp. 205-219. doi: 10.1002/path.4640.
135. Wirtz S., Neurath M. F. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007, vol. 59, no. 11, pp. 1073-1083. doi: 10.1016/j.addr.2007.07.003.
136. Goyal N., Rana A., Ahlawat A., Bijjem K. R. V, Kumar P. Animal models of inflammatory bowel disease: A review. *Inflammopharmacology*, 2014, vol. 22, no. 4, pp. 219–233, doi: 10.1007/s10787-014-0207-y.
137. Keubler L. M., Buettner M., Häger C., Bleich A. A multihit model: Colitis lessons from the interleukin-10-deficient mouse. *Inflamm Bowel Dis.* 2015, vol. 21, no. 8, pp. 1967-1975. doi: 10.1097/MIB.0000000000000468.
138. Paul G., Khare, V. Gasche C. Inflamed gut mucosa: Downstream of interleukin-10. *Eur J Clin Invest.* 2012, vol. 42, no. 1, pp. 95-109. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02552.x.

139. Gadaleta R. M., Garcia-Irigoyen O., Moschetta A. Exploration of Inflammatory Bowel Disease in Mice: Chemically Induced Murine Models of Inflammatory Bowel Disease (IBD). *Curr Protoc Mouse Biol*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 13–28, doi: 10.1002/cpmo.20.
140. Katsandegwaza B., Horsnell W., Smith K. Inflammatory Bowel Disease: A Review of Pre-Clinical Murine Models of Human Disease. *Int J Mol Sci*. 2022, vol. 23, no.16, p. 9344. doi:10.3390/ijms23169344
141. Velcich A. et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2.. *Science*, 2002, vol. 295, no. 5560, pp. 1726–9, doi: 10.1126/science.1069094.
142. Sonnenburg J. L. et al. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*, 2005, vol. 307, no. 5717, pp. 1955–9, doi: 10.1126/science.1109051.
143. Pacheco A. R. et al. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization.. *Nature*, 2012, vol. 492, no. 7427, pp. 113–7, doi: 10.1038/nature11623.
144. Hooper L. V, Xu J., Falk P. G., Midtvedt T., Gordon J. I. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, vol. 96, no. 17, pp. 9833–9838, doi: 10.1073/pnas.96.17.9833.
145. Stahl M. et al. L-fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, vol. 108, no. 17, pp. 7194–7199, doi: 10.1073/pnas.1014125108.
146. Snider T. A., Fabich A. J., Conway T., Clinkenbeard K. D. E. coli O157:H7 catabolism of intestinal mucin-derived carbohydrates and colonization. *Vet Microbiol*, 2009, vol. 136, no. 1–2, pp. 150–154, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.033.
147. Laroui H. et al. Dextran sodium sulfate (dss) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 3, doi: 10.1371/journal.pone.0032084.
148. Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 1990, vol. 98, no. 3, pp. 694–702.
149. Low D., Nguyen D. D., Mizoguchi E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Des Devel Ther*, 2013, vol. 7, pp. 1341–1356, doi: 10.2147/DDDT.S40107.
150. Eichele D. D., Kharbanda K. K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2017, vol. 23, no 33, pp. 6016-6029. doi: 10.3748/wjg.v23.i33.6016.

151. Sampson T. R., Mazmanian S. K. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host Microbe*, 2015, vol. 17, no. 5, pp. 565–576, doi: 10.1016/j.chom.2015.04.011.
152. Emge J. R. et al. Modulation of the microbiota-gut-brain axis by probiotics in a murine model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, vol. 310, no. 11, pp. G989-98, doi: 10.1152/ajpgi.00086.2016.
153. Mähler Convenor M. et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim*, 2014, vol. 48, no. 3, pp. 178–192, doi: 10.1177/0023677213516312.
154. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine: [сайт]. — Washington DC, 2024 URL: https://nap.nationalacademies.org/labcode/search_codes_full.php?labcode_id=12482&user_id=60651 — Текст: электронный.
155. Rodrigues V. F. et al. Acute infection with *Strongyloides venezuelensis* increases intestine production IL-10, reduces Th1/Th2/Th17 induction in colon and attenuates Dextran Sulfate Sodium-induced colitis in BALB/c mice. *Cytokine*, 2018, vol. 111, pp. 72–83, doi: 10.1016/j.cyto.2018.08.003.
156. Morozova M.V., Boldyreva L.V., Borisova M.A., Kozhevnikova E.N. Investigating social communication in mice: A two-intruders test approach. *Journal of Neuroscience Research*. 2024, vol. 102, no. 7. doi: 10.1002/jnr.25365
157. Remedios R., Kennedy A., Zelikowsky M., Grewe B. F., Schnitzer M. J., Anderson D. J. Social behaviour shapes hypothalamic neural ensemble representations of conspecific sex. *Nature*, 2017, vol. 550, no. 7676, pp. 388–392, doi: 10.1038/nature23885.
158. Zolotykh M. A., Kozhevnikova E. N. The effect of social experience on olfactory preference in male mice. *Appl Anim Behav Sci*, 2017, vol. 189, pp. 85–90, doi: 10.1016/j.applanim.2017.01.013.
159. Swaney W. T., Curley J. P., Champagne F. A., Keverne E. B. The Paternally Expressed Gene *Peg3* Regulates Sexual Experience-Dependent Preferences for Estrous Odors. *Behavioral Neuroscience*, 2008, vol. 122, no. 5, pp. 963–973, doi: 10.1037/a0012706.
160. Albert D. J., Dyson E. M., Walsh M. L., Petrovic D. M. Cohabitation with a female activates testosterone-dependent social aggression in male rats independently of changes in serum testosterone concentration. *Physiol Behav*, 1988, vol. 44, no. 6, pp. 735–740, doi: 10.1016/0031-9384(88)90054-6.

161. Pack A. I. et al. Novel method for high-throughput phenotyping of sleep in mice. *Physiol Genomics*, 2007, vol. 28, no. 2, pp. 232–238, doi: 10.1152/physiolgenomics.00139.2006.
162. Kulikov V. A., Khotskin N. V., Nikitin S. V., Lankin V. S., Kulikov A. V., Trapezov O. V. Application of 3-D imaging sensor for tracking minipigs in the open field test. *J Neurosci Methods*, 2014, vol. 235, pp. 219–225, doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.07.012.
163. Kulikov V. A. Algorithm of tracking of intersecting objects based on a sequence of depth images. *Optoelectronics, Instrumentation and Data Processing*, 2016, vol. 52, no. 1, pp. 37–42, doi: 10.3103/S8756699016010064.
164. File S. E., Lippa A. S., Beer B., Lippa M. T. Animal Tests of Anxiety. *Curr Protoc Pharmacol*, 2004, vol. 27, no. 1, pp. 8.3.1-8.3.22, doi: 10.1002/0471141755.ph0538s27.
165. Takao K., Miyakawa T. Light/dark transition test for mice. *Journal of Visualized Experiments*, 2006, no. 1, p. 104, doi: 10.3791/104.
166. Yang M., Crawley J. N. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr Protoc Neurosci*. 2009, Chapter 8:Unit-8.24.doi: 10.1002/0471142301.ns0824s48.
167. Barthel M. et al. Pretreatment of Mice with Streptomycin Provides a Salmonella enterica Serovar Typhimurium Colitis Model That Allows Analysis of Both Pathogen and Host Pretreatment of Mice with Streptomycin Provides a Salmonella enterica Serovar Typhimurium Colitis Model . 2003, vol. 71, no. 5, pp. 2839–2858, doi: 10.1128/IAI.71.5.2839.
168. Ichikawa N. et al. Novel anti-inflammatory agent 3- (dodecylthiocarbonyl)-methyl -glutarimide ameliorates murine models of inflammatory bowel disease. *Inflammation Research*, 2016, vol. 65, no. 3, pp. 245–260, doi: 10.1007/s00011-015-0911-0.
169. Lee H. et al. Scalable control of mounting and attack by Esr1+ neurons in the ventromedial hypothalamus. *Nature*, 2014, vol. 509, no. 7502, pp. 627–632, doi: 10.1038/nature13169.
170. Allen Mouse Brain Atlas: [сайт] / Allen Institute for Brain Science. — Seattle, WA, 2024. — URL: <https://mouse.brain-map.org/static/atlas>. — Текст : электронный.
171. Glinskikh A., Snytnikova O., Zelentsova E., Borisova M., Tsentalovich Y., Akulov A. The Effect of Blood Contained in the Samples on the Metabolomic Profile of Mouse Brain Tissue: A Study by NMR Spectroscopy. *Molecules*, 2021, vol. 26, no. 11, p. 3096, doi: 10.3390/molecules26113096.
172. Suldina L. A., Morozova K. N., Menzorov A. G., Kizilova E. A., Kiseleva E. Mitochondria structural reorganization during mouse embryonic stem cell derivation. *Protoplasma*, 2018, vol. 255, no. 5, pp. 1373–1386, doi: 10.1007/s00709-018-1236-y.

173. Borisova M. A. et al. Fructose Ameliorates Tryptophan Metabolism and Behavioral Abnormalities in a Mouse Model of Chronic Colitis. *Nutrients*, 2020, vol. 12, no. 2, p. 445, doi: 10.3390/nu12020445.
174. Snytnikova O. A., Khlichkina A. A., Sagdeev R. Z., Tsentalovich Y. P. Evaluation of sample preparation protocols for quantitative NMR-based metabolomics. *Metabolomics*, 2019, vol. 15, no. 6, doi: 10.1007/s11306-019-1545-y.
175. Snytnikova O. A. et al. Quantitative metabolomic analysis of the human cornea and aqueous humor. *Metabolomics*, 2017, vol. 13, no. 12, doi: 10.1007/s11306-017-1281-0.
176. Wishart D. S. et al. HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*, 2018, vol. 46, no. D1, pp. D608–D617, doi: 10.1093/nar/gkx1089.
177. Zelentsova E. A., Yanshole L. V., Snytnikova O. A., Yanshole V. V., Tsentalovich Y. P., Sagdeev R. Z. Post-mortem changes in the metabolomic compositions of rabbit blood, aqueous and vitreous humors. *Metabolomics*, 2016, vol. 12, no. 11, doi: 10.1007/s11306-016-1118-2.
178. Tsentalovich Y. P. et al. Metabolomic composition of normal aged and cataractous human lenses. *Exp Eye Res*, 2015, vol. 134, pp. 15–23, doi: 10.1016/j.exer.2015.03.008.
179. Müller V. M. et al. Gut barrier impairment by high-fat diet in mice depends on housing conditions. *Mol Nutr Food Res*, 2016, vol. 60, no. 4, pp. 897–908, doi: 10.1002/mnfr.201500775.
180. Kraeuter A. K., Guest P. C., Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods Mol Biol*, 2019, vol. 1916, pp. 99–103, doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_9.
181. Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, 2003, vol. 463, no. 1–3, pp. 3–33, doi: 10.1016/S0014-2999(03)01272-X.
182. Doty R. L. Odor-guided behavior in mammals. *Experientia*. 1986, vol. 42, no. 3, pp. 257–271. doi:10.1007/BF01942506
183. Sharon G. et al. Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell*, 2019, vol. 177, no. 6, pp. 1600–1618.e17, doi: 10.1016/j.cell.2019.05.004.
184. Banfi D. et al. Impact of Microbial Metabolites on Microbiota–Gut–Brain Axis in Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, vol. 22, no. 4, p. 1623, doi: 10.3390/IJMS22041623.

185. Buffington S. A. et al. Dissecting the contribution of host genetics and the microbiome in complex behaviors. *Cell*, 2021, vol. 184, no. 7, pp. 1740-1756.e16, doi: 10.1016/J.CELL.2021.02.009.
186. Morozova M. V. et al. Colitis-associated intestinal microbiota regulates brain glycine and host behavior in mice. *Scientific Reports* 2022, vol. 12, no. 1, pp. 1–18, doi: 10.1038/s41598-022-19219-z.
187. J. Kirsch. Glycinergic transmission. *Cell Tissue Res.* 2006, vol. 326, no. 2, pp. 535-540. doi: 10.1007/s00441-006-0261-x.
188. Cleveland W. L., DeLaPaz R. L., Fawwaz R. A., Challop R. S. High-dose glycine treatment of refractory obsessive-compulsive disorder and body dysmorphic disorder in a 5-year period. *Neural Plast*, 2009, 768398, doi: 10.1155/2009/768398.
189. File S. E., Curle P. F., Baldwin H. A., Neal M. J. Anxiety in the rat is associated with decreased release of 5-HT and glycine from the hippocampus. *Neurosci Lett*, 1987, vol. 83, no. 3, pp. 318–322, doi: 10.1016/0304-3940(87)90107-8.
190. Soloway J., Stetten, D. The metabolism of choline and its conversion to glycine in the rat. *J Biol Chem.* 1953, vol. 204, no 1, pp. 207 – 214.
191. Yanofsky C. RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria. *RNA*. 2007, vol. 13, no. 8, pp. 1141-1154 doi: 10.1261/rna.620507.
192. Berry D. et al. Intestinal microbiota signatures associated with inflammation history in mice experiencing recurring colitis. *Front Microbiol*, 2015, vol. 6, 1408. doi: 10.3389/fmicb.2015.01408.
193. Achasova K.M., Kozhevnikova E.N., Borisova M.A., Litvinova E.A. Fucose ameliorates *Tritrichomonas* sp.-associated illness in antibiotic-treated *Muc2*^{-/-} mice. *International Journal of Molecular Sciences.* – 2021. – Vol 22, no. 19. doi: 10.3390/IJMS221910699
194. Литвинова Е.А., Ачасова К.М., Борисова М.А., Женило С.В., Прохорчук Е.Б., Кожевникова Е.Н. Роль гена Kaiso в развитии воспаления у мышей с дефицитом Муцина-2. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2018. Т. 22 №8. С. 1078-10831. doi: 10.18699/VJ18.453
195. Fan T.-J. et al. Environmental Factors Modify the Severity of Acute DSS Colitis in Caspase-11-Deficient Mice. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, vol. 24, no. 11, pp. 2394–2403, doi: 10.1093/ibd/izy244.
196. Reinoso Webb C. et al. Differential Susceptibility to T Cell-Induced Colitis in Mice: Role of the Intestinal Microbiota. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, vol. 24, no. 2, pp. 361–379, doi: 10.1093/ibd/izx014.

197. Wenzel U. A. et al. Spontaneous colitis in Muc2-deficient mice reflects clinical and cellular features of active ulcerative colitis. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 6, doi: 10.1371/journal.pone.0100217.
198. Diamanti A. et al. Clinical role of calprotectin assay in determining histological relapses in children affected by inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2008, vol. 14, no. 9, pp. 1229-1235. doi: 10.1002/ibd.20472.
199. Francescone R., Hou V., Grivennikov S. I. Cytokines, IBD, and colitis-associated cancer. *Inflamm Bowel Dis*. 2015, vol. 21, no. 2, pp. 409-418. doi: 10.1097/MIB.0000000000000236.
200. Chang J., Leong R. W., Wasinger V. C., Ip M., Yang M., Phan T. G. Impaired Intestinal Permeability Contributes to Ongoing Bowel Symptoms in Patients With Inflammatory Bowel Disease and Mucosal Healing. *Gastroenterology*, 2017, vol. 153, no. 3, pp. 723-731.e1, doi: 10.1053/j.gastro.2017.05.056.
201. Kumar M., Kisson-Singh V., Coria A. L., Moreau F., Chadee K. Probiotic mixture VSL#3 reduces colonic inflammation and improves intestinal barrier function in muc2 mucin-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, vol. 312, no. 1, pp. G34–G45, doi: 10.1152/ajpgi.00298.2016.
202. Zarepour M. et al. The mucin muc2 limits pathogen burdens and epithelial barrier dysfunction during salmonella enterica serovar typhimurium colitis. *Infect Immun*, 2013, vol. 81, no. 10, pp. 3672–3683, doi: 10.1128/IAI.00854-13.
203. Furuse M. et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: A lesson from claudin-1-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, 2002, vol. 156, no. 6, pp. 1099–1111, doi: 10.1083/jcb.200110122.
204. Tamura A. et al. Megaintestine in Claudin-15–Deficient Mice. *Gastroenterology*, 2008, vol. 134, no. 2, pp. 523-534.e3, doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.040.
205. Guttman J. A., Samji F. N., Li Y., Vogl, A. W. Finlay B. B. Evidence that tight junctions are disrupted due to intimate bacterial contact and not inflammation during attaching and effacing pathogen infection in vivo. *Infect Immun*, 2006, vol. 74, no. 11, pp. 6075–84, doi: 10.1128/IAI.00721-06.
206. Zhang L. et al. *Musca domestica* Cecropin (Mdc) alleviates salmonella typhimurium-induced colonic mucosal barrier impairment: Associating with inflammatory and oxidative stress response, tight junction as well as intestinal flora. *Front Microbiol*, 2019, vol. 10, doi: 10.3389/fmicb.2019.00522.

207. Jiang W. et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*, 2015, vol. 5, doi: 10.1038/srep08096.
208. Mishra A. et al. Structural and Functional Changes in the Tight Junctions of Asymptomatic and Serology-negative First-degree Relatives of Patients with Celiac Disease. *J Clin Gastroenterol*, 2016, vol. 50, no. 7, pp. 551–560, doi: 10.1097/MCG.0000000000000436.
209. Borisova M. A. et al. Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium. *Sci Rep*, 2020, vol. 10, no. 1, doi: 10.1038/s41598-020-78141-4.
210. Selinger C. P., Bannaga A. Inflammatory bowel disease and anxiety: links, risks, and challenges faced. *Clin Exp Gastroenterol*, 2015, vol. 8, p. 111, doi: 10.2147/CEG.S57982.
211. Ferretti P. et al. Mother-to-Infant Microbial Transmission from Different Body Sites Shapes the Developing Infant Gut Microbiome. *Cell Host Microbe*, 2018, vol. 24, no. 1, pp. 133-145.e5, doi: 10.1016/J.CHOM.2018.06.005.
212. Liu X. et al. High-fiber diet mitigates maternal obesity-induced cognitive and social dysfunction in the offspring via gut-brain axis. *Cell Metab*, 2021, vol. 33, no. 5, pp. 923-938.e6, doi: 10.1016/J.CMET.2021.02.002.
213. Morozova M.V., et al., *Akkermansia muciniphila* mediates antibiotic-induced impairment of female preference in mice. *bioRxiv*, 2025 DOI:10.1101/2025.09.19.677244
214. McGaughey K. D. et al. Relative abundance of *Akkermansia* spp. and other bacterial phylotypes correlates with anxiety- and depressive-like behavior following social defeat in mice. *Sci Rep*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, doi: 10.1038/s41598-019-40140-5.
215. Zhai Q., Feng S., Arjan N., Chen W. A next generation probiotic, *Akkermansia muciniphila*. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019, vol. 59, no. 19, pp. 3227-3236. doi: 10.1080/10408398.2018.1517725.
216. Rodríguez-Piñeiro A. M. et al. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals *Muc2* and *Muc5ac* accompanied by a set of core proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, vol. 305, pp. 348–356, doi: 10.1152/ajpgi.00047.2013.
217. Burokas A. et al. Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. *Biol Psychiatry*, 2017, vol. 82, no. 7, pp. 472–487, doi: 10.1016/j.biopsych.2016.12.031.
218. Blacher E. et al. Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice. *Nature*, 2019, vol. 572, no. 7770, pp. 474–480, doi: 10.1038/s41586-019-1443-5.

219. Ou Z. et al. Protective effects of *Akkermansia muciniphila* on cognitive deficits and amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutr Diabetes*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, doi: 10.1038/s41387-020-0115-8.
220. Wang J. et al. *Akkermansia muciniphila*-derived SCFAs improve the depression-like behaviors of mice by inhibiting neuroinflammation. *Pharmacol Res*, 2025, vol. 220, doi: 10.1016/j.phrs.2025.107938.
221. Liu X. et al. Rescue of social deficits by early-life melatonin supplementation through modulation of gut microbiota in a murine model of autism. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2022, vol. 156, doi: 10.1016/j.biopha.2022.113949.
222. Martin A. M., Sun E. W., Rogers G. B., Keating D. J. The influence of the gut microbiome on host metabolism through the regulation of gut hormone release. *Front Physiol*, 2019, vol. 10, 428, doi: 10.3389/fphys.2019.00428.
223. Mithieux G. Gut Microbiota and Host Metabolism: What Relationship. *Neuroendocrinology*, 2018, vol. 106, no. 4, pp. 352–356, doi: 10.1159/000484526.
224. Pizzamiglio L. et al. Excitatory glycine receptors control ventral hippocampus synaptic plasticity and anxiety-related behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2025, vol. 122, no. 37, doi: 10.1073/pnas.2501118122.
225. Romano K. A. et al. Metabolic, Epigenetic, and Transgenerational Effects of Gut Bacterial Choline Consumption. *Cell Host Microbe*, 2017, vol. 22, no. 3, pp. 279-290.e7, doi: 10.1016/j.chom.2017.07.021.
226. Razak, M. A. Begum P. S., Viswanath B., Rajagopal S. Multifarious Beneficial Effect of Nonessential Amino Acid, Glycine: A Review. *Oxid Med Cell Longev*. 2017, vol. 2017, 1716701 doi: 10.1155/2017/1716701.
227. Wurtman, R. J., Cansev, M., Ulus, I. H. Choline and its products acetylcholine and phosphatidylcholine. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Neural lipids*, 2009, (3rd ed.), pp. 443–501. doi: 10.1007/978-0-387-30378-9_18.
228. Agam G., Taylor Z., Vainer E., Golan H. M. The influence of choline treatment on behavioral and neurochemical autistic-like phenotype in *Mthfr*-deficient mice. *Transl Psychiatry*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 1–14, doi: 10.1038/s41398-020-01002-1.
229. Huang F. et al. Betaine ameliorates prenatal valproic-acid-induced autism-like behavioral abnormalities in mice by promoting homocysteine metabolism. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2019, vol. 73, no. 6, pp. 317–322, doi: 10.1111/pcn.12833.

230. Yoshihara S. et al. Betaine ameliorates schizophrenic traits by functionally compensating for KIF3-based CRMP2 transport. *Cell Rep*, 2021, vol. 35, no. 2, p. 108971, doi: 10.1016/j.celrep.2021.108971.
231. Cohen E. L., Wurtman R. J. Brain acetylcholine: Increase after systematic choline administration. *Life Sci*, 1975, vol. 16, no. 7, pp. 1095–1102, doi: 10.1016/0024-3205(75)90194-0.
232. Koshimura K. et al. Effects of Choline Administration on In Vivo Release and Biosynthesis of Acetylcholine in the Rat Striatum as Studied by In Vivo Brain Microdialysis. *J Neurochem*, 1990, vol. 54, no. 2, pp. 533–539, doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb01904.x.
233. Onono F. O., Morris A. J. Phospholipase d and choline metabolism. in *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2020, vol. 259, pp. 205–218. doi: 10.1007/164_2019_320.
234. Li Z., Vance D. E. Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *J Lipid Res*. 2008, vol. 49, no. 6, pp. 1187-1194. doi: 10.1194/jlr.R700019-JLR200.
235. Plovier H. et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med*, 2017, vol. 23, no. 1, pp. 107–113, doi: 10.1038/nm.4236.
236. Tadesse S. et al. MUC2 mucin deficiency alters inflammatory and metabolic pathways in the mouse intestinal mucosa. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 42, doi: 10.18632/oncotarget.16886.
237. Ye J. et al. Deletion of mucin 2 induces colitis with concomitant metabolic abnormalities in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2021, vol. 320, no. 5, pp. G791–G803, doi: 10.1152/ajpgi.00277.2020.
238. Karigo T. et al. Distinct hypothalamic control of same- and opposite-sex mounting behaviour in mice. *Nature*, 2021, vol. 589, no. 7841, doi: 10.1038/S41586-020-2995-0.
239. Stowers L., Holy T. E., Meister M., Dulac C., Koentges G. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science*, 2002, vol. 295, no. 5559, pp. 1493–1500, doi: 10.1126/SCIENCE.1069259/SUPPL_FILE/1069259S3.MOV.
240. Kim Y. et al. Mapping social behavior-induced brain activation at cellular resolution in the mouse. *Cell Rep*, 2015, vol. 10, no. 2, pp. 292–305, doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.014.
241. Hashikawa K., Hashikawa Y., Falkner A., Lin D. The neural circuits of mating and fighting in male mice. *Curr Opin Neurobiol*. 2016, vol. 38, pp. 27-37. doi: 10.1016/j.conb.2016.01.006.

242. Zoicas I, Kornhuber J. The Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Social Behavior in Rodents. *Int J Mol Sci*, 2019, vol. 20, no. 6, doi: 10.3390/IJMS20061412.
243. Zoicas I., Kornhuber J. The role of the n-methyl-d-aspartate receptors in social behavior in rodents. *Int J Mol Sci*. 2019, vol. 20, no. 22, p. 5599. doi: 10.3390/ijms20225599.
244. Darwish M., Hattori S., Nishizono H., Miyakawa T., Yachie N., Takao K. Comprehensive behavioral analyses of mice with a glycine receptor alpha 4 deficiency. *Mol Brain*, 2023, vol. 16, no. 1, doi: 10.1186/s13041-023-01033-x.
245. Dvorzhak A., Brecht, M. Schmitz D. Social play behavior is driven by glycine-dependent mechanisms. *Current Biology*, 2024, vol. 34, no. 16, pp. 3654-3664.e6, doi: 10.1016/j.cub.2024.06.073.
246. Zhuravleva Z. D., Mogutina M. A., Mukhina I. V., Druzin M. Y. Effects of Glycine Receptors of the Medial Preoptic Nucleus on Sexual Behavior of Male Wistar Rats. *Bull Exp Biol Med*, 2020, vol. 169, no. 3, pp. 299–301, doi: 10.1007/s10517-020-04873-y.
247. Perše M., Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*, 2012, vol. 2012, p. 718617. doi: 10.1155/2012/718617.
248. Macia L. et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun*, 2015, vol. 6, p. 6734, doi: 10.1038/ncomms7734.
249. Matsunaga T. et al. Protective Effect of Daikenchuto on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *Gastroenterol Res Pract*, 2017, vol. 2017, pp. 1–8, doi: 10.1155/2017/1298263.
250. Algieri F. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of the Serpylli herba extract in experimental models of rodent colitis. *J Crohns Colitis*, 2014, vol. 8, no. 8, pp. 775–788, doi: 10.1016/j.crohns.2013.12.012.
251. Garrido-Mesa N. et al. The association of minocycline and the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 results in an additive beneficial effect in a DSS model of reactivated colitis in mice. *Biochem Pharmacol*, 2011, vol. 82, no. 12, pp. 1891–1900, doi: 10.1016/j.bcp.2011.09.004.
252. Marcobal A. et al. Bacteroides in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host Microbe*, 2011, vol. 10, no. 5, pp. 507–514, doi: 10.1016/j.chom.2011.10.007.
253. Martens E. C., Chiang H. C., Gordon J. I. Mucosal Glycan Foraging Enhances Fitness and Transmission of a Saccharolytic Human Gut Bacterial Symbiont. *Cell Host Microbe*, 2008, vol. 4, no. 5, pp. 447–457, doi: 10.1016/j.chom.2008.09.007.

254. Koetzner L., Grover G., Boulet J., Jacoby H. I. Plant-derived polysaccharide supplements inhibit dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *Dig Dis Sci*, 2010, vol. 55, no. 5, pp. 1278–1285, doi: 10.1007/s10620-009-0848-7.
255. Fitton J. H. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Mar Drugs*. 2011, vol. 9, no. 10, pp. 1731-1760. doi: 10.3390/md9101731.
256. Lee S. H. et al. Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. *Carbohydr Polym*, 2012, vol. 89, no. 2, pp. 599–606, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.03.056.
257. Kuznetsova T. A., Besednova N. N., Somova L. M., Plekhova N. G. Fucoidan extracted from *Fucus evanescens* prevents endotoxin-induced damage in a mouse model of endotoxemia. *Mar Drugs*, 2014, vol. 12, no. 2, pp. 886–898, doi: 10.3390/md12020886.
258. Lan A. et al. Dual effects of a high-protein diet on DSS-treated mice during colitis resolution phase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, vol. 311, no. 4, pp. G624–G633, doi: 10.1152/ajpgi.00433.2015.
259. He R., Li Y., Han C., Lin R., Qian W., Hou X. L-Fucose ameliorates DSS-induced acute colitis via inhibiting macrophage M1 polarization and inhibiting NLRP3 inflammasome and NF- κ B activation. *Int Immunopharmacol*, 2019, vol. 73, pp. 379–388, doi: 10.1016/j.intimp.2019.05.013.
260. Nagalingam N. A., Kao J. Y., Young V. B. Microbial ecology of the murine gut associated with the development of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, vol. 17, no. 4, pp. 917–926, doi: 10.1002/ibd.21462.
261. Munyaka P. M., Rabbi M. F., Khafipour E., Ghia J.-E. Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice. *J Basic Microbiol*, 2016, vol. 56, no. 9, pp. 986–998, doi: 10.1002/jobm.201500726.
262. Nikolaus S. et al. Increased Tryptophan Metabolism Is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 2017, vol. 153, no. 6, pp. 1504-1516.e2, doi: 10.1053/j.gastro.2017.08.028.
263. Gupta N. K. et al. Serum analysis of tryptophan catabolism pathway: Correlation with Crohn's disease activity. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, vol. 18, no. 7, pp. 1214–1220, doi: 10.1002/ibd.21849.
264. Qu C. et al. Patchouli alcohol ameliorates dextran sodium sulfate-induced experimental colitis and suppresses tryptophan catabolism. *Pharmacol Res*, 2017, vol. 121, pp. 70–82, doi: 10.1016/j.phrs.2017.04.017.

265. Zhang X. J. et al. Palmatine ameliorated murine colitis by suppressing tryptophan metabolism and regulating gut microbiota. *Pharmacol Res*, 2018, vol. 137, pp. 34–46, doi: 10.1016/j.phrs.2018.09.010.
266. Xie G., Keyhani N. O., Bonner C. A., Jensen R. A. Ancient Origin of the Tryptophan Operon and the Dynamics of Evolutionary Change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, vol. 67, no. 3, pp. 303–342, doi: 10.1128/membr.67.3.303-342.2003.
267. Kiser D., Steemer B., Branchi I., Homberg J. R. The reciprocal interaction between serotonin and social behaviour. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012, vol. 36, no. 2, pp. 786-798. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.12.009.
268. Liu Y., Jiang Y. A., Si Y., Kim J. Y., Chen Z. F., Rao Y. Molecular regulation of sexual preference revealed by genetic studies of 5-HT in the brains of male mice. *Nature*, 2011, vol. 472, no. 7341, pp. 95-99 doi: 10.1038/nature09822.
269. Khan N, Mendonca L, Dhariwal A, et al. Intestinal dysbiosis compromises alveolar macrophage immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol*. 2019, vol. 12, no. 3, pp. 772-783. doi:10.1038/s41385-019-0147-3
270. Erokhina M V, Kurygina A V, Onishchenko G E. Mitochondria are targets for the antituberculosis drug rifampicin in cultured epithelial cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2013, vol. 78, no. 10, pp. 1155-63. doi: 10.1134/S0006297913100106.
271. Yurtseve İ., Üstündağ Ü., Ünal İ, Ateş P., Emekli-Alturfan E. Rifampicin decreases neuroinflammation to maintain mitochondrial function and calcium homeostasis in rotenone-treated zebrafish. *Drug Chem Toxicol*. 2022, vol. 45, no. 4, pp. 1544-1551. doi: 10.1080/01480545.2020.1846549.
272. Park D., Choi D., Lee J., Lim D., Park C. Male-like sexual behavior of female mouse lacking fucose mutarotase. *BMC Genet*, 2010, vol. 11, no. 1, p. 62, doi: 10.1186/1471-2156-11-62.
273. Yirmiya R., Avitsur R., Donchin O., Cohen E. Interleukin-1 inhibits sexual behavior in female but not in male rats. *Brain Behav Immun*. 1995, vol. 9, no. 3, pp. 220-233. doi: 10.1006/brbi.1995.1021.
274. Yirmiya R. et al. The role of brain cytokines in mediating the behavioral and neuroendocrine effects of intracerebral mycoplasma fermentans. *Brain Res*, 1999, vol. 829, no. 1–2, pp. 28–38, doi:10.1016/s0006-8993(99)01274-3.
275. Coyne M. J., Reinap B., Lee M. M., Comstock L. E. Human Symbionts Use a Host-Like Pathway for Surface Fucosylation. *Science*, 2005, vol. 307, no. 5716, pp. 1778–1781, doi: 10.1126/science.11106469.

276. Lucente Di J, Tena J, Bai Y, Shafer CC, Mendiola UR, Neumann EK, Chen X, Lebrilla CB, Maezawa I, Jin LW. 1-Fucose is a candidate monosaccharide neuromodulator and mitigates Alzheimer's synaptic deficit. *Sci Adv.* 2025, vol. 11, no. 45, doi: 10.1126/sciadv.adt4123.
277. Takahashi K., Hong L., Kurokawa K., Miyagawa K., Takeda H., Tsuji. M. Brexpiprazole prevents colitis-induced depressive-like behavior through myelination in 1 the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2023, vol. 121, no. 110666. doi:10.1016/j.pnpbp.2022.110666.
278. Takumi T., Tamada K., Hatanaka F., Nakai N., Bolton P. F. Behavioral neuroscience of autism. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020, vol. 110, pp. 60–76, doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.04.012.
279. Pourhamzeh M. et al. The Roles of Serotonin in Neuropsychiatric Disorders. *Cell Mol Neurobiol.* 2022, vol. 42, no. 6, pp. 1671-1692. doi: 10.1007/s10571-021-01064-9.
280. Rai D. et al. Sertraline for anxiety in adults with a diagnosis of autism (STRATA): study protocol for a pragmatic, multicentre, double-blind, placebo-controlled randomised controlled trial. *Trials*, 2024, vol. 25, no. 1, doi: 10.1186/s13063-023-07847-3.
281. Staley JK, Malison RT, Innis RB. Imaging of the serotonergic system: interactions of neuroanatomical and functional abnormalities of depression. *Biol Psychiatry.* 1998, vol. 44, no. 7, pp. 534-549, doi:10.1016/s0006-3223(98)00185-1.
282. Hornung JP. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat.* 2003, vol. 26, no. 4, pp. 331-343. doi: 10.1016/j.jchemneu.2003.10.002.
283. Amstislavskaya TG, Popova NK. The roles of different types of serotonin receptors in activation of the hypophyseal-testicular complex induced in mice by the presence of a female. *Neurosci Behav Physiol.* 2004, vol. 34, no. 8, pp. 833-837. doi:10.1023/b:neab.0000038136.27999.3d
284. Popova NK. From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *Bioessays.* 2006, vol. 28, no. 5, pp. 495-503. doi:10.1002/bies.20412.
285. Takahashi A, Quadros IM, de Almeida RM, Miczek KA. Brain serotonin receptors and transporters: initiation vs. termination of escalated aggression. *Psychopharmacology (Berl).* 2011, vol. 213, no. 2-3, pp. 183-212. doi:10.1007/s00213-010-2000-y doi: 10.1007/s00213-010-2000-y.
286. Manchia M, Carpiniello B, Valtorta F, Comai S. Serotonin Dysfunction, Aggressive Behavior, and Mental Illness: Exploring the Link Using a Dimensional Approach. *ACS Chem Neurosci.* 2017, vol. 8, no. 5, pp. 961-972. doi: 10.1021/acschemneuro.6b00427.

287. Hull E. M., Dominguez J. M. Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav*, 2007, vol. 52, no. 1, pp. 45–55, doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.03.030.
288. Yonezawa A. et al. Ejaculatory response induced by a 5-HT₂ receptor agonist m-CPP in rats: Differential roles of 5-HT₂ receptor subtypes. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008, vol. 88, no. 4, pp. 367–373, doi: 10.1016/j.pbb.2007.09.009.
289. Burri, A. Hysi P., Clop, A. Rahman Q., Spector T. D. A genome-wide association study of female sexual dysfunction. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 4, doi: 10.1371/journal.pone.0035041.
290. Waldinger MD, Berendsen HH, Blok BF, Olivier B, Holstege G. Premature ejaculation and serotonergic antidepressants-induced delayed ejaculation: the involvement of the serotonergic system. *Behav Brain Res*. 1998, vol. 92, no. 2, pp. 111-118. doi:10.1016/S0166-4328(97)00183-6.
291. Jacobsen P. L., Mahableshwarkar A. R., Chen, Y. Chrones L., Clayton A. H. Effect of Vortioxetine vs. Escitalopram on Sexual Functioning in Adults with Well-Treated Major Depressive Disorder Experiencing SSRI-Induced Sexual Dysfunction. *Journal of Sexual Medicine*, 2015, vol. 12, no. 10, pp. 2036–2048, doi: 10.1111/jsm.12980.
292. Hull E. M. Sex, drugs and gluttony: How the brain controls motivated behaviors. *Physiol Behav*, 2011, vol. 104, no. 1, pp. 173–177, doi: 10.1016/j.physbeh.2011.04.057.
293. Guptarak J., Sarkar J., Hiegel C., Uphouse L. Role of 5-HT_{1A} receptors in fluoxetine-induced lordosis inhibition. *Horm Behav*, 2010, vol. 58, no. 2, pp. 290–296, doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.03.003.
294. Barberio B, Zamani M, Black CJ, Savarino EV, Ford AC. Prevalence of symptoms of anxiety and depression in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2021, vol. 6, no. 5, pp. 359-370. doi:10.1016/S2468-1253(21)00014-5.
295. Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol*. 2015, vol. 37, no. 1, pp. 47-55. doi:10.1007/s00281-014-0454-4.
296. Brill J., Shao Z., Puche A. C., Wachowiak M., Shipley M. T. Serotonin increases synaptic activity in olfactory bulb glomeruli. *J Neurophysiol*, 2016, vol. 115, pp. 1208–1219, doi: 10.1152/jn.00847.2015.
297. Hellweg R., Zueger M., Fink K., Hörtnagl H., Gass P. Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas. *Neurobiol Dis*, 2007, vol. 25, no. 1, pp. 1–7, doi: 10.1016/j.nbd.2006.07.017.

298. Leybold BG, Yu CR, Leinders-Zufall T, Kim MM, Zufall F, Axel R. Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, vol. 99, no. 9, pp. 6376-6381. doi:10.1073/pnas.082127599
299. Li Q. et al. Synchronous evolution of an odor biosynthesis pathway and behavioral response. *Current Biology*, 2013, vol. 23, no. 1, pp. 11–20, doi: 10.1016/j.cub.2012.10.047.
300. Espinoza S. et al. Trace Amine-Associated Receptor 5 Provides Olfactory Input Into Limbic Brain Areas and Modulates Emotional Behaviors and Serotonin Transmission. *Front Mol Neurosci*, 2020, vol. 13, doi: 10.3389/fnmol.2020.00018.
301. Wu X. et al. *Bacteroides vulgatus* alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis and depression-like behaviour by facilitating gut-brain axis balance. *Front Microbiol*, 2023, vol. 14, doi: 10.3389/fmicb.2023.1287271.
302. Van Paassen N. B. et al. Colitis development during the suckling-weaning transition in mucin *muc2*-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, vol. 301, no. 4, doi: 10.1152/ajpgi.00199.2010.
303. Lu P. et al. Colonic gene expression patterns of mucin *Muc2* knockout mice reveal various phases in colitis development.. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, vol. 17, no. 10, pp. 2047–57, doi: 10.1002/ibd.21592.
304. Koolhaas J. M., Coppens C. M., de Boer S. F., Buwalda B., Meerlo P., Timmermans P. J. A. The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. *J Vis Exp*, 2013, no. 77, doi: 10.3791/4367.
305. Lenschow C, Mendes ARP, Lima SQ. Hearing, touching, and multisensory integration during mate choice. *Front Neural Circuits*. 2022, vol. 16, 943888. doi: 10.3389/fncir.2022.943888.
306. Baum MJ, Cherry JA. Processing by the main olfactory system of chemosignals that facilitate mammalian reproduction. *Horm Behav*. 2015, vol. 68, pp. 53-64. doi: 10.1016/j.yhbeh.2014.06.003.
307. Chamero P. et al. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature*, 2007, vol. 450, no. 7171, pp. 899–902, doi: 10.1038/nature05997.
308. Muroi, Y. Ishii T., Komori S., Kitamura N., Nishimura M. Volatile female odors activate the accessory olfactory system of male mice without physical contact. *Neuroscience*, 2006, vol. 141, no. 2, pp. 551–558, doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.04.026.
309. Keller M, Pierman S, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J. The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *Eur J Neurosci*. 2006, vol. 23, no. 2, pp. 521-530. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04589.x

310. Murataeva N., Mattox S., Yust K., Du, W. Straiker A. Murine vaginal secretory responses to a male volatile chemical messenger. *Sci Rep*, 2024, vol. 14, no. 1, doi: 10.1038/s41598-024-77983-6.
311. Demir E. et al. The pheromone darcin drives a circuit for innate and reinforced behaviours. *Nature*, 2020, vol. 578, no. 7793, pp. 137–141, doi: 10.1038/s41586-020-1967-8.
312. DiBenedictis B. T., Ingraham K. L., Baum M. J., Cherry J. A. Disruption of urinary odor preference and lordosis behavior in female mice given lesions of the medial amygdala. *Physiol Behav*, 2012, vol. 105, no. 2, pp. 554–559, doi: 10.1016/j.physbeh.2011.09.014.
313. Chen P., Hong W. Neural Circuit Mechanisms of Social Behavior. *Neuron*, 2018, vol. 98, no. 1, pp. 16–30, doi: 10.1016/J.NEURON.2018.02.026.
314. Screven L. A., Dent M. L. Preference in female laboratory mice is influenced by social experience. *Behavioural Processes*, 2018, vol. 157, pp. 171–179, doi: 10.1016/j.beproc.2018.09.011.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1

Последовательности праймерных олигонуклеотидов.

Мишень	Название праймера	Последовательность, 5' – > 3'
<i>Akkermansia muciniphila</i>	AMUC- F	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC
	AMUC-R	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT
<i>TNF-α, Mus musculus</i>	TNF_RNA F	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	TNF_RNA R	GGCACCACTAGTTGGTTGTCTTT
<i>Il-1β, Mus musculus</i>	Il1b-F	TGAAGTTGACGGACCCCAA
	Il1b-R	TGATGTGCTGCTGCGAGATT
<i>Ido-1, Mus musculus</i>	Ido-1 F	CGAGGGGATGACGATGTTCG
	Ido-1 R	CAGTCCCCACCAGGAAATGA
<i>E.coli TrpD</i>	ESCH_TRPD_F	ACCTGGCAGATCAGTTGC
	ESCH_TRPD_R	GAGAAAGCATCAGCACCG
<i>Bifidobacterium TrpD</i>	BIFI_TRPD_F	ATGGCCGA(A/T/G)ATCACATGG
	BIFI_TRPD_R	GTCCACAA(A/G)CCACTCCGATT
<i>Tubb5, Mus musculus</i>	betaTub_F	TGAAGCCACAGGTGGCAAGTAT
	betaTub_R	CCAGACTGACCGAAAACGAAGT
	16S_F	TCCTACGGGAGGCAGCAG

Универсальная область 16S рРНК, <i>Bacteria</i>	16S_R	ATTACCGCGGCTGCTGG
<i>И10, Mus musculus</i>	И10-F4	AAGGCAGTGGAGCAGGTGA
	И10-R4	CTATGCAGTTGATGAAGATGTCA
<i>И17α, Mus musculus</i>	И17a-F4	TCAAAGCTCAGCGTGTCCAA
	И17a-R4	GGGTCTTCATTGCGGTGGA